

**Zellbiologische und biochemische Charakterisierung
des *Ustilago maydis* Virulenzfaktors Mcs1
(Myosin-Chitinsynthase 1)**



DISSERTATION

**zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Steffi Treitschke
aus Lauchhammer

Marburg/Lahn, 2010

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von September 2006 bis März 2010 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für organismische Interaktionen sowie der School of Biosciences an der Universität Exeter unter Betreuung von Prof. Dr. Gero Steinberg durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am 29.3.2010.

Erstgutachter:	Prof. Dr. Gero Steinberg
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2010

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „**Zellbiologische und biochemische Charakterisierung des *Ustilago maydis* Virulenzfaktors Mcs1 (Myosin-Chitinsynthase 1)**“ selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

Steffi Treitschke

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht:

Treitschke, S., Doehlemann, G., Schuster M. und Steinberg, G. (2010). The myosin-motor domain of a fungal class V chitin synthase is required for plant pathology but dispensable for chitosome motility. (eingereicht)

Treitschke, S., Schuster, M.; Molloy, J., Harmer, N.; Martin-Urdiroz, M.; Doehlemann, G. und Steinberg, G. (2010). Fungal myosin-17 tethers secretory vesicles to sites of exocytosis. (eingereicht)

I. ZUSAMMENFASSUNG

Infektionen von Wirtspflanzen durch pathogene Pilze erfordert polares Spitzenwachstum, ein Prozess, der die kontinuierliche polare Anlieferung von Zellwandkomponenten und Enzymen, wie Chitinsynthasen (CHS), entlang des Cytoskeletts benötigt. Klasse V CHS sind als Virulenzfaktoren für die pathogene Entwicklung essentiell. Diese potentiellen molekularen Motoren bestehen aus einer Myosin-Motordomäne (MMD), die mit einer CHS-Domäne fusioniert sind. Letztere ist am Aufbau der pilzlichen Zellwand beteiligt, die Rolle der MMD bleibt bisher ungeklärt. Eine nahe liegende Rolle könnte die MMD-vermittelte Anlieferung sekretorischer Vesikel (Chitosomen) zur Wachstumszone sein. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss beider Domänen in Mcs1, der Klasse V CHS in *U. maydis*, untersucht. Durch quantitative Analysen von Krankheitssymptomen, Besiedlung der Pflanze und Auswertungen morphometrischer Parameter wurde gezeigt, dass beide Domänen essentielle, jedoch ungleiche Rollen, für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* spielen. Während der Phänotyp der G₃Mcs1^{Chsdead}-Mutante dem der Deletionsmutante ähnelt, konnte die Besiedelung des Pflanzengewebes durch Stämme, die Defekte in der Motordomäne aufwiesen, noch teilweise erfolgen. *mcs1*-Deletionsmutanten und CHS-aktivitätsdefekte Stämme werden schnell durch das pflanzliche Abwehrsystem erkannt und getötet. Mutanten bei denen die MMD deletiert wurden verursachen nur eine abgeschwächte Abwehrreaktion. Der Verlust der Klasse V CHS Aktivität führt vermutlich zu gravierenden Mängeln in der Zellwandzusammensetzung, wodurch polares *in planta* Wachstum gestört und der Infektionsprozess verlangsamt wird. Eine Folge dessen ist eine starke pflanzliche Abwehrreaktion, die durch die Bildung von H₂O₂ und lokalem Zelltod charakterisiert ist. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die apikale Mcs1-Lokalisierung von der eigenen MMD abhängt. Jedoch wurde auch beobachtet, dass noch wenige Chitosomen die Plasmamembran erreichen. Dadurch kann intrazelluläres Hyphenwachstum in begrenztem Maße erfolgen und *U. maydis* kann die Pflanzenzelle besiedeln.

Eine Strukturanalyse verdeutlichte, dass trotz geringer Sequenzidentitäten die Mcs1 MMD der Struktur veröffentlichter Myosinmotoren ähnelt. Des Weiteren konnte belegt werden, dass die Mcs1 MMD an Aktin bindet und in der Lage ist Dimere auszubilden. In *in vivo* Motilitätsversuche wurde nachgewiesen, dass sich Mcs1-gebundene Chitosomen schnell und bi-direktional über lange Strecken bewegen und kurz bevor sie sekretiert werden in subapikalen Bereichen der Plasmamembran verharren. Die Insertion in die Membran erfolgt dabei selten und zufällig und es wurde gezeigt, dass die Verweildauer am Apex bei MMD-defizienten Mutanten signifikant verkürzt war. Wohingegen die apikale Mcs1-Akkumulation von F-Aktin und der eigenen MMD abhängt, spielen bei der Motilität von Chitosomen sowohl Aktin als auch Mikrotubuli eine Rolle und ist nicht abhängig von der MMD. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die eigene MMD nicht für die apikale Anlieferung verantwortlich ist, sondern eher lokale Funktionen in der Exozytose von Chitosomen übernimmt.

II. SUMMARY

Invasion of the host by phytopathogenic fungi occurs by polar expansion of the fungal cell, a process also called hyphal tip growth. Tip growth requires continuous synthesis of fungal cell wall components at the hyphal apex and is therefore based on polar delivery of enzymes, like chitin synthases (CHS), along cytoskeleton tracks. In particular, class V CHS are fungal virulence factors required for plant infection. These putative motor proteins consist of a myosin-motor domain (MMD) fused to a CHS domain which participates in fungal cell-wall formation. The function of the MMD is unknown, but it might deliver secretory vesicles (chitosomes) to the growth region. In this work, the importance of both domains in Mcs1, the class V CHS of the corn smut fungus *Ustilago maydis*, was investigated. By quantitative analysis of disease symptoms, tissue colonization and single-cell morphogenic parameters it was demonstrated that both domains play essential though unequal roles during plant infection. While infections with G₃Mcs1^{Chsdead}-mutants display phenotypes similar to the deletion mutants, MMD mutants exhibit partial colonization of the plant tissue. *mcs1*-deletion mutants and strains defective in CHS activity are rapidly recognized and killed by the plant, whereas mutants lacking the MMD can invade the host tissue and cause moderate plant responses. The absence of the class V CHS in *mcs1*-deletion mutants most likely causes major defects in the fungal cell wall, thereby affecting polarized growth and decelerating the infection process. This results in strong plant defense responses characterized by the formation H₂O₂ and local cell death which might be elicited by defective cell wall composition of *mcs1*-deletion and G₃Mcs1^{Chsdead}-mutants. Microscopic analysis revealed that apical focussing of Mcs1 depends on a functional MMD, although some chitosomes were rarely able to reach the apex. As a consequence, hyphal growth is partially rescued and *U. maydis* can partially colonize the host tissue until moderate plant responses stops the infection.

Structural analysis revealed that despite low sequence similarities the Mcs1 MMD adapts folding of a myosin head. Furthermore the MMD binds to F-actin and forms dimers and *in vivo* analysis revealed that Mcs1-bound chitosomes exhibit bi-directional long-distant movements at high velocities. Prior to exocytosis, chitosomes often pause in sub apical regions of the plasma membrane and insertion into the membrane occurs only rarely and randomly. It was determined that residence times at the apex are significantly shorter in mutants lacking the MMD. Whereas apical localisation of Mcs1 depends on F-actin and the MMD, chitosome motility requires both actin and microtubules and persisted when the Mcs1 MMD was deleted. The results suggest that fungal specific exocytosis, but not delivery, of the essential class V CHS is promoted by its own MMD, explaining the importance of both parts for fungal virulence.

III. ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
Δ	Deletion	Lat A	Latrunculin A
Abb.	Abb.	M	Molar (g/l)
<i>ad</i>	zum Endvolumen auffüllen	mM	Millimolar (mg/l)
AF-x	Alexafluor-Wellenlänge in nm	min	Minute
As	Aminosäure	MMD	Myosin-Motordomäne
Bp	Basenpaare	N-terminal	aminoterminal
BDM	2,3-Butanedione-Monoxime	OD _{x nm}	optische Dichte gemessen bei x nm
bzw.	beziehungsweise	<i>on planta</i>	auf der Pflanzenoberfläche
Cbx	Carboxin	ORF	offenes Leseraster („open reading frame“)
cDNA	„complementary DNA“	PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
CHS	Chitinsynthase	PD	„potato dextrose“
C-terminal	carboxyterminal	PEG	Polyethylenglykol
DIC	„ <u>d</u> ifferential <u>i</u> nterference <u>c</u> ontrast“	Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	qRT-PCR	quantitative „real-time“ Polymerasekettenreaktion
Da	Dalton	rev	„reverse“
d. h.	das heißt	fwd	„forward“
gDNA	genomische DNA	RNA	Ribonukleinsäure
ggf.	gegebenenfalls	RT	Raumtemperatur
HA	Hämagglutinin	RT-PCR	„reverse transcripton“ PCR
His	Histidin	s.	siehe
h/hrs	Stunde/Stunden	U	Unit (Enzymaktivität)
hpi	Stunden nach Infektion („ <u>h</u> ours <u>p</u> ost <u>i</u> nfection“)	u. a.	unter anderem
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser	Upm	Umdrehungen pro Minute
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser	vgl.	vergleiche
dpi	Tage nach Infektion („ <u>d</u> ays <u>p</u> ost <u>i</u> nfection“)	z. B.	zum Beispiel
<i>in planta</i>	innerhalb des Pflanzengewebes		
kb	Kilobasen		
kDa	Kilodalton		

I. INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	Das <i>Ustilago maydis</i> / <i>Zea mays</i> Pathosystem	5
1.2	Die <i>Ustilago maydis</i> Infektion und seine Auswirkungen auf die Pflanze	6
1.3	Polares Wachstum in filamentösen Pilzen	8
1.4	Die Rolle des Cytoskeletts und molekularer Motoren bei polaren Transportprozessen	9
1.4.1	Die Rolle Aktin-abhängiger Motoren für das polare Wachstum in Pilzen	12
1.5	Die Bedeutung von Chitinsynthasen für das polare Wachstum bei Pilzen	14
1.5.1	Klasse V Chitinsynthasen sind pilzliche Pathogenitätsfaktoren	15
1.6	Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit	17
2	ERGEBNISSE	18
2.1	Mcs1 ist eine Klasse V Chitinsynthase	18
2.2	Sequenzanalyse und strukturelle Modellierung der Myosin-Motordomäne	19
2.3	Funktionelle Untersuchungen zur Myosinmotor- und Chitinsynthase-Domäne	23
2.3.1	Saprophytisches Wachstum der Deletions- und Punktmutationsstämme	25
2.3.2	Die Rolle der Motor- und Chitinsynthase-Domäne für die Pathogenität	26
2.3.3	Mikroskopische Charakterisierung des Infektionsverlaufes	28
2.4	Charakterisierung der Pflanzenreaktion nach Infektionen mit <i>mcs1</i> -Mutationsstämmen	33
2.4.1	<i>mcs1</i> -Mutationsstämme induzieren eine Akkumulation von H ₂ O ₂	33
2.4.2	<i>mcs1</i> -Mutanten induzieren einen Apoptose-ähnlichen Zelltod	34
2.4.3	Transkriptionsanalysen infizierter Maispflanzen	35
2.5	G ₃ Mcs1-Lokalisationsstudien	37
2.6	Die Rolle des Cytoskeletts für die Anlieferung von Mcs1	38
2.7	Lokalisierung der Mcs1-Mutationsproteine	40
2.7.1	Lokalisierung der Mcs1-Mutationsproteine in haploiden Sporidien	40
2.7.2	Lokalisierung der Mcs1-Mutationsproteine in infiziertem Maisgewebe	41
2.8	Mcs1-Motilitätsanalysen	44
2.9	G ₃ Mcs1 ^{ΔMM} -Motilitätsanalysen	46
2.10	Der Einfluss von <i>U. maydis</i> Myosinen auf die Mcs1-Anlieferung	47
2.11	Die Funktion der Motordomäne an der apikalen Plasmamembran	51
2.12	Biochemische Charakterisierung der Myosin-Motordomäne	52
2.12.1	Heterologe und homologe Proteinexpression	52
2.12.2	Charakterisierung der Coiled coil Region mittels Gelfiltration	52
2.12.3	Untersuchung zur Aktinbindung mittels Co-Sedimentation	54

3	DISKUSSION	57
3.1	Sowohl die Mcs1 Motor- als auch die Chitinsynthase-Domäne sind für die pathogene Entwicklung von <i>U. maydis</i> essentiell	57
3.2	Mcs1-Mutanten können keine kompatible Interaktion mit <i>Z. mays</i> etablieren	59
3.3	Die polare Lokalisation von Mcs1 ist abhängig vom Acto-Myosin-System	64
3.4	Die Mcs1 Myosin-Motordomäne weist strukturelle Ähnlichkeiten zu Myosinen auf	65
3.5	Die MMD ist für die polare Lokalisierung von Mcs1 essentiell	69
3.6	Mcs1-gebundene Chitosomen werden nicht durch die eigene Motordomäne transportiert	72
3.7	Was ist die Funktion von Mcs1 an der apikalen Wachstumszone?	75
3.8	Zusammenfassung und Ausblick	77
4	MATERIAL UND METHODEN	79
4.1	Material und Bezugsquellen	79
4.1.1	Chemikalien	79
4.1.2	Puffer und Lösungen	79
4.1.3	Enzyme	79
4.1.4	Verwendete Kits und sonstiges Material	79
4.2	Zellkultivierung	79
4.2.1	Kutivierung von <i>E. coli</i>	79
4.2.2	Kutivierung von <i>U. maydis</i>	80
4.2.3	Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen	81
4.3	Stämme, Oligonukleotide und Vektoren	81
4.3.1	<i>E. coli</i> Stämme	81
4.3.2	<i>U. maydis</i> Stämme	81
4.3.3	Oligonukleotide	84
4.3.4	Vektoren	87
4.4	Mikrobiologische Standardmethoden	90
4.5	Standardmethoden für <i>E. coli</i>	90
4.5.2	Kultivierung von <i>U. maydis</i>	90
4.6	Molekularbiologische Methoden	91
4.6.1	Isolierung von Nukleinsäuren	91
4.6.2	In vitro Modifikation von Nukleinsäuren	93
4.6.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	94
4.6.4	Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren	94
4.6.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	94
4.6.6	Ortspezifische Mutagenese von Nukleinsäuren	95
4.6.7	Sequenzierung von Nukleinsäuren	95
4.6.8	Analyse von gDNA Modifikationen mittels Southern-Blot	95

4.7	Proteinbiochemische Methoden	97
4.7.1	Antikörper	97
4.7.2	Gewinnung von Proteinextrakten aus <i>U. maydis</i>	97
4.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	98
4.7.4	Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Western-Blot)	98
4.8	Pflanzenmethoden	99
4.8.1	Maisvarietäten (<i>Zea mays</i> sp.)	99
4.8.2	Kultivierung von <i>Z. mays</i>	99
4.8.3	Infektion von <i>Z. mays</i> mit <i>U. maydis</i>	99
4.8.4	Quantifizierung von <i>U. maydis</i> Infektionen	99
4.8.5	Quantifizierung von <i>U. maydis</i> Infektionen mittels qPCR	100
4.9	Färbungen, Mikroskopie und Bildverarbeitung	100
4.9.1	Färbung mit WGA/Alexafluor-488 von lebendem Gewebe	100
4.9.2	Färbung mit WGA-Alexafluor-488 und Propidium-Iodid von fixierten Pflanzen	101
4.9.3	Färbung von Membranen mit FM4-64	101
4.9.4	Diaminobenzidinfärbung	101
4.9.5	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie und Bildverarbeitung	101
4.9.6	Epifluoreszenz Mikroskopie	102
4.9.7	Laser-basierte Epifluoreszenz-Mikroskopie und FRAP (<i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i>)	102
4.9.8	Bildverarbeitung	102
4.9.9	Bioinformatische Analysen	103
4.10	Strukturelle Modellierung	103
4.11	Untersuchungen zur Dimerisierung mittels Gelfiltration	104
4.12	Co-Sedimentation der Myosin-Motordomäne mit Aktin	104
5	LITERATURVERZEICHNIS	105

1 EINLEITUNG

1.1 Das *Ustilago maydis* / *Zea mays* Pathosystem

Der fakultativ biotrophe Basidiomycet *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrands, der ausschließlich *Zea mays* (Christensen, 1963) und dessen putative Urform Teosinte (*Zea mays* subsp. *mexicana*, syn. *Euchlena mexicana*) infizieren kann (Doebley, 1992). Da dieser dimorphe Brandpilz genetisch leicht zugänglich ist und an allen oberirdischen Teilen der Pflanze deutlich sichtbare Krankheitssymptome induziert, hat er sich sowohl als Modellorganismus für phytopathogene Pilze als auch für Untersuchungen des Cytoskeletts etabliert (Banuett & Herskowitz, 2002; Steinberg & Perez-Martin, 2008; Weber et al, 2003; Wedlich-Söldner et al, 2000).

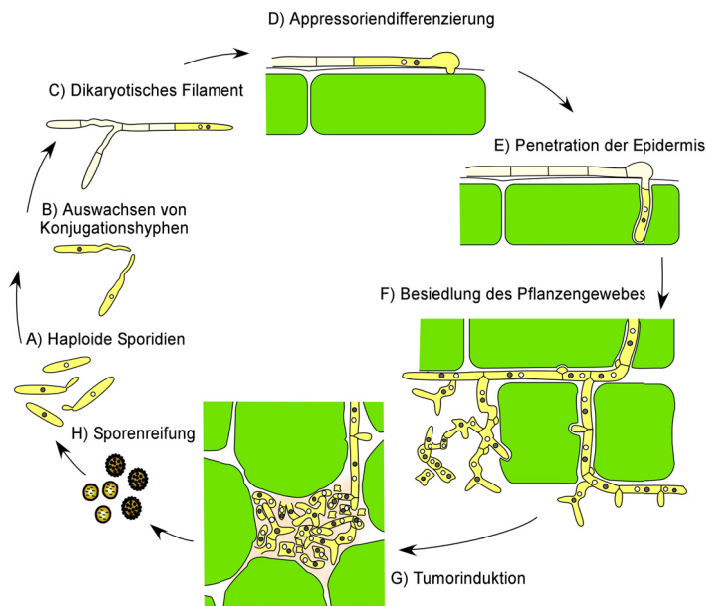


Abb. 1. Schematische Darstellung des di-phasischen Lebenszyklus von *U. maydis* in Abhängigkeit von seiner Wirtspflanze *Z. mays*. Während der saprophytischen Phase (A-C) wächst *U. maydis* Hefe-ähnlich durch Knospung. Nach der Paarung kompatibler Sporidien bildet sich ein dikaryotisches Filament, das die Pflanze mit Hilfe eines Appressoriums penetriert. Die Hyphen wachsen fortan intra- und interzellulär ohne die Wirtszellen zu beschädigen. Schließlich bildet der Pilz Aggregate im Apoplasten des Pflanzengewebes. In diesem Stadium erfolgt die Karyogamie, die Hyphenfragmentierung und es entwickeln sich diploide Sporen. Reife Sporen werden nach Aufplatzen des Gewebes freigesetzt. Unter geeigneten Bedingungen können sie auskeimen, die Meiose durchlaufen und haploide Sporidien bilden. (Die Abbildung wurde verändert nach Kämper et al (2006) und Doehlemann et al (2008b).)

Die pathogene Entwicklung von *U. maydis* ist wie bei allen Brandpilzen an die sexuelle Entwicklung gekoppelt. Dabei spielt der Wechsel zwischen Hefe-artigem und filamentösem Wachstum als Virulenzfaktor eine wichtige Rolle (Abb. 1). Auf der Maisblattoberfläche treffen zwei haploide Sporidien unterschiedlichen Paarungstyps aufeinander und können sie sich über ein durch den bi-allelischen α -Lokus kodiertes Pheromon-Rezeptor-System gegenseitig wahrnehmen (Banuett, 1995). Die Pheromonperzeption führt zur Bildung unseptierter Konjugationshyphen (Abb. 1B), die vermutlich anhand eines Pheromongradienten polar aufeinander zuwachsen und an ihren apikalen Spitzen fusionieren (Snetselaar et al, 1996). Es entsteht die infektiöse Form, das dikaryotische Filament (Abb.

1C; (Snetselaar, 1993). Nach der Zellfusion wächst das filamentöse Dikaryon unter Einzug von Septen auf der Pflanzenoberfläche, wobei lediglich das apikale Hyphensegment mit Cytoplasma gefüllt ist; ältere Hyphenbereiche bestehen aus leeren Segmenten (Brefeld, 1883; Christensen, 1963; Steinberg et al, 1998). Etwa 16 Stunden nach der Infektion arretiert das Hyphenwachstum auf der Blattoberfläche durch bisher noch unbekannte Faktoren und die Hyphe bildet an ihrer Spitze eine leicht geschwollene, nicht-melanisierte Penetrationsstruktur, das so genannte Appressorium, aus (Abb. 1D; (Snetselaar, 1992). Aus diesem Appressorium entwickeln sich infektiöse Hyphen, die direkt in das Pflanzengewebe eindringen können (Abb. 1E). Die pflanzliche Plasmamembran wird dabei invaginiert und umschließt schlauchartig die eingedrungenen Pilzhypen (Doehlemann et al, 2009; Snetselaar, 1993). Dadurch entsteht eine spezielle biotrophe Interaktionszone, in der der Austausch von Signalen und die Aufnahme von Nährstoffen stattfinden kann (Brefort et al, 2009). Während der frühen Infektionsphase dringt *U. maydis* intrazellulär durch regelmäßiges Verzweigen der Hyphen in die tieferen Gewebsschichten vor und ist häufig in der Nähe der Leitbündel zu beobachten (Abb. 1F). Das Überqueren von einer Pflanzenzelle zur Nächsten ähnelt dabei der Penetration der Epidermis und scheint während des intrazellulären Wachstums eine entscheidende Rolle zu spielen (Doehlemann et al, 2009). Unter Laborbedingungen beginnt die Tumorinduktion bereits vier Tage nach der Infektion und ist durch eine verstärkte Verzweigung und massive Proliferation der Pilzhypen im Apoplasten gekennzeichnet (Doehlemann et al, 2008b; Snetselaar, 1994). Im Verlauf von sechs bis zwölf Tagen bilden sich in zellfreien Bereichen des Mesophyllgewebes große Pilzaggregate (Doehlemann et al, 2008b). Die Tumorbildung geht dabei mit einer Vergrößerung der Pflanzenzellen sowie mitotischen Teilungen einher, die vermutlich durch Eingriffe in den Phytohormonhaushalt der Pflanze durch *U. maydis* induziert werden (Doehlemann et al, 2008a; Kämper et al, 2006; Reineke et al, 2008). Während der Induktion des Tumorwachstums kann auch die Akkumulation von Anthocyanen beobachtet werden, die durch eine Rotfärbung der infizierten Bereiche sichtbar wird. Im Tumorgewebe erfolgt die Karyogamie, die Pilzhypen fragmentieren und differenzieren zu diploiden Teliosporen (Banuett, 1995; Banuett, 1996; Kahmann, 2000; Snetselaar, 1994). Nach deren Freisetzung wird in den Sporen die Meiose induziert und in geeigneter, feuchter Umgebung entstehen haploide Sporidien (Abb. 1H; (Christensen, 1963; Kahmann, 2000).

1.2 Die *Ustilago maydis* Infektion und seine Auswirkungen auf die Pflanze

Wie alle biotrophen Pilze ist auch *U. maydis* davon abhängig, dass seine Wirtspflanze während der pathogenen Entwicklung überlebt und ihn mit Nährstoffen versorgt. Das

erfolgreiche Umprogrammieren des Metabolismus der Pflanze zu Gunsten des Pathogens ist Voraussetzung für die Entwicklung einer kompatiblen biotrophen Interaktion (Dangl, 1995; Doehleemann et al, 2008b). In kompatiblen Interaktionen, wie bei *U. maydis* / *Zea mays*, kann das Pathogen das Verteidigungssystem der Pflanze erfolgreich umgehen oder aktiv supprimieren. In inkompatiblen Interaktionen ist der Wirt in der Lage das Pathogen erfolgreich abzuwehren, indem er es rechtzeitig erkennt (Dangl, 1995; Staskawicz et al, 1995).

Die Reaktion von Maispflanzen auf eine *U. maydis* Infektion mit dem solopathogenen Stamm SG200 (Kämper et al, 2006) wurde auf transkriptioneller Ebene während spezifischer Stadien mit Hilfe des „Affymetrix Microarray Systems“ untersucht (Doehleemann et al, 2008a). Der haploide Stamm SG200 ist genetisch so manipuliert, dass er ohne vorherige Paarung auf der Pflanzenoberfläche filamentös wachsen kann und dadurch ein wertvolles Hilfsmittel darstellt, um die Rolle von möglichen Virulenzfaktoren zu untersuchen (Kämper et al, 2006). Die Transkriptom-Analyse infizierter Maispflanzen zeigte, dass der Pilz auf der Blattoberfläche zunächst erkannt wird und eine starke, jedoch eher unspezifische Abwehrreaktion hervorruft (Doehleemann et al, 2008a). Die frühe, vorübergehende Hochregulation der pflanzlichen Abwehrgene weist darauf hin, dass *U. maydis* von der Pflanze durch konservierte Strukturen von Pathogenen, so genannte MAMPS oder PAMPS („microbial-/pathogen-associated molecular patterns“), wie beispielsweise Chitin der pilzlichen Zellwände, erkannt wird (Eckardt, 2008; Nürnberger & Brunner, 2002; Nürnberger et al, 2004). Dies kann zu einer PAMP-vermittelten Resistenz der Pflanze führen, die der Synthese von PR-Proteinen, mit der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, „reactive oxygen species“), wie H_2O_2 , und der Bildung antimikrobieller Substanzen einhergeht (Baker et al, 1997; Jones & Dangl, 2006). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass PAMP-vermittelte Signalwege vor und während der Penetrationsphase durch *U. maydis* aktiviert werden. Mit der Etablierung der biotrophen Interaktion nach etwa 24 Stunden jedoch werden diese frühen Abwehrreaktionen wieder abgeschwächt (Doehleemann et al, 2008a). Dies spiegelt eine Suppression des Zelltods (Hypersensitive Reaktion; HR) durch *U. maydis* wieder, sobald die biotrophe Interaktionsphase eingeleitet und die kompatible Interaktion ermöglicht wird. Wichtige Zelltod-Regulatoren als Reaktion auf pilzliche Pathogene sind ROS (Wojtaszek, 1997). Nekrotrophe Pathogene, wie *Botrytis cinerea*, induzieren eine massive Produktion von H_2O_2 und O_2^{2-} , was zu einem unkontrollierten Absterben pflanzlicher Zellen im infizierten Bereich führt (Govrin et al, 2006). Die massive Akkumulation von ROS muss daher in einer biotrophen Interaktion verhindert werden.

1.3 Polares Wachstum in filamentösen Pilzen

Wie andere filamentöse Pilze verbreitet sich der dimorphe Pilz *U. maydis* in seiner Umgebung, beispielsweise auf der Pflanzenoberfläche, durch die lokale Ausdehnung der Hyphenspitze, und ist zusätzlich während verschiedener Stadien seines komplexen Zellzyklus auf gerichtete Wachstumsprozesse angewiesen (Abb. 2; rote Pfeile).

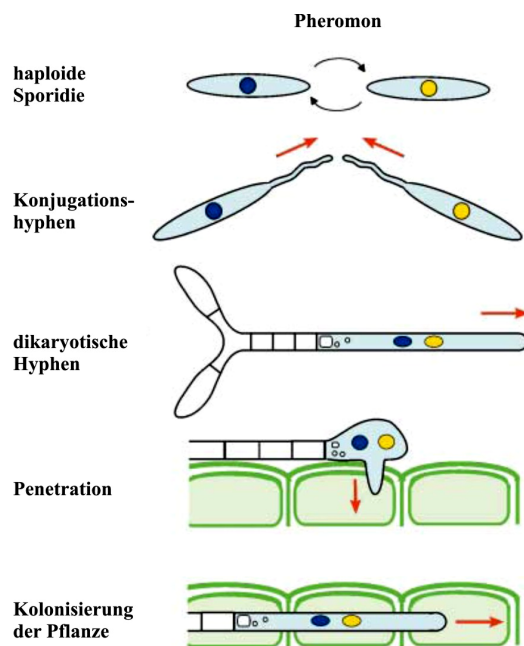


Abb. 2. Schematische Darstellung der frühen Stadien des pathogenen Lebenszyklus von *U. maydis*. Auf der Pflanzenoberfläche kommt es zur Erkennung haploider Sporidien unterschiedlichen Paarungstyps durch ein Pheromon-Pheromonrezeptor-System. Dies hat eine morphologische Veränderung des Hefeartigen Wachstums zur Folge und es werden Konjugationshyphen, die apikales Wachstum zeigen, ausgebildet. Diese Hyphen fusionieren und es entsteht ein infektiöses dikaryotisches Filament. Dieses zeigt gerichtetes Spitzenwachstum auf der Pflanzenoberfläche. Vor der Penetration ändert die Hyphe ihre Wachstumsrichtung und penetriert die pflanzliche Epidermis durch eine Appressorien-ähnliche Struktur. *U. maydis* kann anschließend *Zea mays* durch gerichtetes Wachstum besiedeln. Polares Spitzenwachstum ist durch rote Pfeile gekennzeichnet. (Die Abbildung wurde entnommen aus Steinberg (2007).)

Grundlage des apikalen Hyphenwachstums ist die polare Synthese von Zellwandbestandteilen, wie Chitin, und die Dehnbarkeit der Zellwand (Sietsma, 1994). Wie durch das „steady-state“ Modell beschrieben, bleibt die Zellwand an der Hyphenspitze durch polare Ablagerungen von Zellwandmaterial elastisch, während basale Zellregionen über eine erhöhte Festigkeit verfügen (Wessels, 1990). In den Spitzen wachsender Hyphen diverser Basidio-, Asco- und Deuteromyceten konnte eine dynamische Akkumulation verschiedener Vesikel, Ribosomen und Cytoskelettelemente beobachtet werden, die „Spitzenkörper“ genannt wird (Brunswick, 1924; Girbardt, 1955). Bartnicki-Garcia und Mitarbeiter weisen auf eine Funktion des Spitzenkörpers als Vesikel-Versorgungszentrum („vesicle supply center“; VSC) hin (Bartnicki-Garcia et al, 1995). Man stellt sich dabei vor, dass das VSC als Vorratslager Membran umschlossener sekretorischer Vesikel dient, die durch kontrollierte Exozytose an der Hyphenspitze entlassen und verteilt werden. Dadurch wird das Spitzenwachstum gelenkt und die Form der Hyphe determiniert (Bartnicki-Garcia et al, 1995; Harris et al, 2005).

In verschiedenen Untersuchungen konnte auch eine Akkumulation endozytotischer Farbstoffe, wie FM4-64, innerhalb des Spitzenkörpers beobachtet werden (Fischer-Parton et al, 2000; Harris et al, 2005; Hoffmann & Mendgen, 1998). Dies weist auf zusätzliche Funktionen des Spitzenkörpers in endozytotischen Prozessen hin (Abb. 3).

Die genaue Zusammensetzung der Spitzenkörper-Vesikel ist bisher noch weitestgehend ungeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass es sich um vom Golgi-Apparat stammende Vesikel handelt, die sekretorische Proteine, Membranbausteine, Enzyme und Zellwandbausteine enthalten (Bartnicki-Garcia, 2006; Sietsma et al, 1996). Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen in verschiedenen Pilzen zeigten, dass beispielsweise leichte Ketten von Myosinen, die Formine, TeaA und TeaR (Homologe der Zellend-Marker Tea1 und Mod5 aus *Schizosaccharomyces pombe*) und zwei Chitinsynthasen Komponenten des Spitzenkörpers sind (Crampin et al, 2005; Riquelme et al, 2007; Sharpless & Harris, 2002; Takeshita et al, 2008). Formine sind Aktin bindende Proteine, die an das Plusende („barbed end“) von Aktin-Filamenten binden und dabei die Aktin-Nukleierung unterstützen (Evangelista et al, 2002; Pruyne et al, 2002). Die Akkumulation von Forminen im Spitzenkörper weist daher auf eine Orientierung von Aktin-Filamenten (F-Aktin) in Richtung der Wachstumsregion hin. Eine Anreicherung von Aktin-Plusenden zur Plasmamembran hin deutet wiederum auf einen Einfluss Aktin-abhängiger und zum Plusende gerichteter Motoren in exozytotischen Prozessen hin.

1.4 Die Rolle des Cytoskeletts und molekularer Motoren bei polaren Transportprozessen

Sowohl das Mikrotubuli- als auch das Aktin-Cytoskelett spielen für die Morphogenese von Pilzhyphen sowie bei polaren Transportprozessen eine essentielle Rolle (Abb. 3). Störungen des Mikrotubuli-Cytoskeletts oder Mikrotubuli-abhängiger Motoren, wie Kinesin, Dynein und Dynactin führen zu einer instabilen polaren Wachstumsachse, jedoch nicht zum endgültigen Verlust des apikalen Wachstums (Konzack et al, 2005; Lehmle et al, 1997; Riquelme et al, 2000; Schuchardt et al, 2005). Die Zerstörung des Aktin-Cytoskeletts hingegen verursacht einen kompletten Verlust der Zellpolarität und führt zu unregelmäßigem Wachstum (Harris et al, 2005; Heath et al, 2000; Torralba et al, 1998; Virag & Griffiths, 2004).

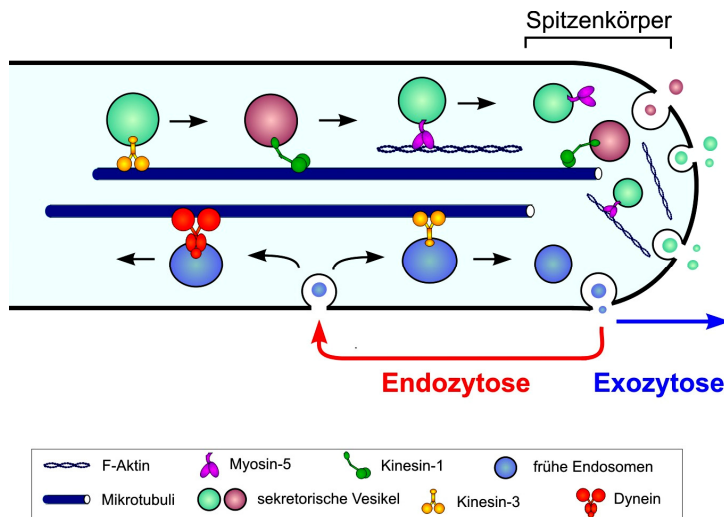


Abb. 3. Schematische Darstellung des Cytoskeletts und der Einfluss molekularer Motoren auf das Spitzenwachstum von *U. maydis*. Sowohl Endozytose als auch Exozytose spielen bei der Aufrechterhaltung des polaren Wachstums eine entscheidende Rolle. Auch das Aktin- und das Mikrotubuli-Cytoskelett sind für gerichtetes Wachstum essentiell. Kinesine und Dynein transportieren ihr „cargo“ (z. B. Vesikel) entlang polarer Mikrotubuli in unterschiedliche Richtungen, wohingegen Myosine F-Aktin, das sich oft an der Hyphenspitze konzentriert, nutzen. (Die Abbildung wurde nach Steinberg (2000) und (2007) modifiziert.)

Im Allgemeinen glaubt man, dass sekretorische Vesikel in zwei Schritten zur Zellperipherie befördert werden: Zunächst erfolgt der Transport zum Spitzenkörper hauptsächlich über Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziierte Motoren (Steinberg, 2007a; Virag & Harris, 2006). Anschließend werden Vesikel über das apikale Aktin-Cytoskelett, das durch den Arp2/3 organisiert wird (Machesky & Gould, 1999), und einem „Exozyst-Komplex“, der für das Andocken und die Fusion verantwortlich ist (Lipschutz & Mostov, 2002), zur Oberfläche der Plasmamembran befördert (Abb. 3; (Brand & Gow, 2009)). Es konnte gezeigt werden, dass das Mikrotubuli-Cytoskelett für das Spitzenwachstum von Hyphen essentiell ist (Fuchs et al, 2005; Horio & Oakley, 2005). Zum Plusende gerichtete Kinesine spielen eine Rolle im Ausbau und der Positionierung des Spitzenkörpers (Konzack et al, 2005; Lehmler et al, 1997; Seiler et al, 1997), und unterstützen somit die Ausdehnung der Pilzhypen (Schuchardt et al, 2005; Wu et al, 1998a). In den letzten Jahren wurde auch vermehrt die Rolle von Aktin-abhängigen Myosinen, die den Transport über kürzere Strecken an der Zellperipherie gewährleisten, in exozytotischen Prozessen diskutiert (Loubery & Coudrier, 2008).

Myosine sind molekulare Motoren, die die Energie aus der Hydrolyse von ATP nutzen, um sich entlang von Aktin-Filamenten zu bewegen (Kollmar et al, 2002). Basierend auf Sequenzvergleichen schwerer Ketten wurden bisher mehr als 30 verschiedene Myosinklassen identifiziert (Foth et al, 2006; Odrionitz & Kollmar, 2007; Richards & Cavalier-Smith, 2005). Die allgemeine Proteinstruktur weist eine N-terminale stark konservierte globuläre Myosin-Motordomäne (MMD) sowie eine Hals- („neck“) Domäne und eine Schwanz- („tail“) Domäne auf. In der MMD befinden sich die Bindungsstellen zur Interaktion mit Aktin und eine zentrale Kernregion, der die Nukleotid-Bindungs-/Hydrolysierungsstellen enthält (Vale, 1996). Diese Kernregion enthält eine Gruppe konservierter Sequenzmotive, wie den P-loop

und die Switch I und Switch II Regionen, die die Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat vermitteln (Sasaki & Sutoh, 1998). Erweiterungen der zentralen Kernregion bilden die Aktin-Bindungsstellen und die „Relay“, „Converter“ und „lever“-Arm-Regionen aus. Die Hauptfunktion dieser drei Domänen ist die Signalverstärkung kleiner Konformationsänderungen innerhalb des aktiven Zentrums, was die Bewegung entlang von Aktin-Filamenten ermöglicht (Geeves & Holmes, 1999). In der „neck“-Region befindet sich mindestens ein IQ-Motiv, das Bindungsstellen für Calmodulin-artige leichte Ketten besitzt und als so genannter „lever“-Arm die schrittweise Bewegung unterstützt. Das „swinging neck-lever“-Modell von Myosin-Motoren beschreibt dabei, dass sich die „lever“-Arm-Domäne im Motorkopf neigt und während der ATP Hydrolyse in Richtung der katalytischen Domäne schwingt (Uyeda et al, 1996). Die Schwanzregion von Myosinen enthält gegebenenfalls Coiled Coil Regionen, die die Ausbildung von Dimeren unterstützen (Grallert et al, 2007; Mermall et al, 1998). Des Weiteren reagiert diese Domäne mit dem jeweiligen „cargo“ und variiert stark aufgrund der vielseitigen Funktionen der unterschiedlichen Myosine während der Muskelkontraktion, Membrantransport, Aktin-Organisation, Mechano-Sensing, Signaltransduktion sowie Endo- und Exozytose (O'Connell et al, 2007).

Die Meinung, dass Myosine den Transport des jeweiligen „cargos“ über kurze Strecken vermitteln ist weit verbreitet (Langford, 1995). Allerdings sind nicht alle in exozytotische Prozesse involvierte Myosine prozessiv, d. h. sie können ihr „cargo“ nicht entlang von Aktin-Filamenten schrittweise bewegen. Dennoch gibt es mehrere Mechanismen, wie diese Aktin-abhängigen, nicht prozessiven Motoren zum Transport sekretorischer Vesikel vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran beitragen (Abb. 4; (Loubery & Coudrier, 2008)).

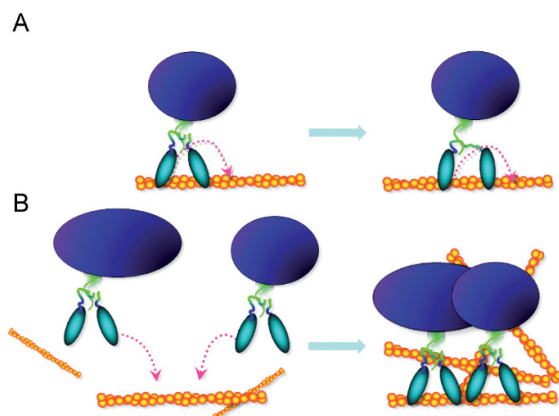


Abb. 4. Mögliche Funktionen von Myosinen im Transport und der Dynamik Membranschlüssender Vesikel. (A) Prozessive Myosin-Motoren können ihr „cargo“ entlang von Aktin-Filamenten transportieren. (B) Myosine können die Bindung, das Andocken und die Verschmelzung mit der Plasmamembran durch eine Umstrukturierung des Aktin-Netzwerks regulieren und dadurch sekretorische Vesikel vorübergehend „abfangen“, wodurch deren Fusion begünstigt wird. (Die Abbildung wurde modifiziert nach (Loubery & Coudrier, 2008)).

Beispielsweise können einige Myosine, wie Myo2, Myo6 und Myo1e, die Organisation des Aktin-Netzwerks kontrollieren und gegebenenfalls eine Funktion als Aktin-Quervernetzer übernehmen (Abb. 4B; (Loubery & Coudrier, 2008)). Dadurch könnten sekretorische Vesikel

vom Aktin-Netzwerk „abgefangen“ und deren Fusion mit der Plasmamembran begünstigt werden (Rogat & Miller, 2002). Andere Myosine unterstützen die Verschmelzung von Vesikeln mit der Plasmamembran, indem sie mit anderen Proteinen zusammenwirken. Beispielsweise interagieren Myo1c und ein Klasse V Myosin aus *Saccharomyces cerevisiae* (Myo2p) mit Komponenten des Exozyst (Chen et al, 2007; Seabra & Coudrier, 2004). Myo5a (*Mus musculus*) hingegen geht eine Interaktion mit dem t-SNARE Syntaxin-1, das in exozytotischen Prozessen involviert ist, ein (Watanabe et al, 2005).

1.4.1 Die Rolle Aktin-abhängiger Motoren für das polare Wachstum in Pilzen

Über die Funktion Aktin-abhängiger Motoren für das pilzliche Spitzenwachstum ist bisher wenig bekannt. Wenn man sich jedoch die Organisation und Bedeutung des Aktin-Cytoskeletts in wachsenden Hyphen näher betrachtet (Banuett et al, 2008), ist es sehr wahrscheinlich, dass Myosin-abhängige Transportprozesse entlang von Mikrofilamenten das polare Wachstum unterstützen. Das Aktin-Cytoskelett in *U. maydis* besteht beispielsweise, wie in anderen Pilzen, aus drei Strukturen: fleckigen Aktin-Ansammlungen („patches“), filamentösen Aktin-Strängen („cables“) und einem Aktin-Ring, der während der Zellteilung in der Teilungs-Region gebildet wird (Banuett et al, 2008). In *U. maydis* Hyphen sind an der Hyphenspitze eine ausgeprägte Aktin-Kappe, die hauptsächlich aus Aktin-patches besteht, und polare, zur Spitze hin wachsende, Aktin-Stänge zu beobachten (Banuett & Herskowitz, 2002).

Die bisher sequenzierten Genome filamentöser Pilze kodieren für vier Myosinklassen: Klasse I Myosine, Klasse II Myosine, Klasse V Myosine und in einigen Fällen ein Klasse XVII Myosin, das am C-Terminus an eine Chitinsynthase-Domäne fusioniert ist (Klassifizierung: (Hodge & Cope, 2000). Letztere Myosinklasse ist spezifisch für filamentöse Pilze und kommt nicht in den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* vor.

In beiden Modellorganismen konnte bereits die Rolle von Klasse V Myosinen für die Anlieferung sekretorischer Vesikeln zur Wachstumsregion experimentell bestätigt werden (Govindan et al, 1995; Johnston et al, 1991; Motegi et al, 2001; Mulvihill et al, 2006; Schott et al, 2002; Win et al, 2001). Für Myo2p beispielsweise, einem Klasse V Myosin aus *S. cerevisiae*, wurde der prozessive Transport sekretorischer Vesikel zur wachsenden Spitze experimentell belegt (Abb. 4A, (Schott et al, 2002). Des Weiteren wurde in *Candida albicans* gezeigt, dass sowohl das polare Wachstum als auch die Pathogenität von MYO2, einem Klasse V Myosin, abhängig sind (Woo et al, 2003). Während Klasse V Myosine beim Transport Membran-umschlossener, sekretorischer Vesikel während des Spitzenwachstums

eine Rolle spielen, scheinen Klasse I Myosine das pilzliche Wachstum durch endozytotische Prozesse zu beeinflussen. Erste Hinweise darauf kamen aus Untersuchungen in *S. cerevisiae*, wo die Deletion der Klasse I Myosine *myo3* und *myo5* zu einer Inhibition der Endozytoseaktivität führte und polares Wachstum nahezu aufgehoben wurde (Geli & Riezman, 1996). In den filamentösen Pilzen *Aspergillus nidulans* und *C. albicans* wurde ebenfalls die essentielle Rolle von Klasse I Myosinen für das Hyphenwachstum experimentell nachgewiesen (McGoldrick et al, 1995; Oberholzer et al, 2004; Oberholzer et al, 2002; Oshero et al, 1998). In beiden Organismen ist die Myosin-I-Aktivität für die Aufnahme des endozytotischen Markerfarbstoffs FM4-64 in die Vakuole essentiell (Oberholzer et al, 2004; Yamashita & May, 1998). Erstaunlicherweise zeigten Mutationsanalysen in MyoA, dem Klasse I Myosin aus *A. nidulans*, dass die ATPase-Aktivität für das Hyphenwachstum keine Rolle spielt (Liu et al, 2001). Dies weist darauf hin, dass eine Bewegung der Myosin-Motordomäne von MyoA entlang der Aktin-Filamente nicht nötig ist, um endozytotische Prozessen zu vermitteln. Stattdessen wird die Internalisierung Membran-umschlossener Vesikel an der Plasmamembran durch eine MyoA-vermittelte lokale Aktinpolymerisation angetrieben (Fehrenbacher et al, 2003; Kaksonen et al, 2006; Merrifield, 2004). Dabei spielen die C-terminalen Bereiche der Klasse I Myosine für die Induktion der Aktinpolymerisation eine Rolle (Evangelista et al, 2000; Geli et al, 2000; Lee et al, 2000). Denkbar wäre, dass die Motordomäne die Lokalisation vermittelt, während der C-terminale Bereich die Internalisierung und Bewegung endozytotischer Vesikel durch Aktinpolymerisation unterstützt (Oberholzer et al, 2004; Yamashita & May, 1998). Auswirkungen der Myosin-I Deletionen auf Hyphenwachstum und -morphologie können vermutlich durch deren Rolle in der Wiederaufnahme Zellwand-verändernder Enzyme, wie Chitinsynthasen, erklärt werden.

Ähnlich wie in anderen filamentösen Pilzen kodiert das Genom von *U. maydis* für vier Myosine, ein Klasse I Myosin (Myo1), ein Klasse II Myosin (Myo2), ein Klasse V Myosin (Myo5) und ein Klasse XVII Myosin (MyoXVII; Mcs1, Myosin-Chitinsynthase) (Klassifizierung: (Hodge & Cope, 2000)). Bislang wurden lediglich einige Funktionen von Myo5 und der Myosin-Chitinsynthase Mcs1 (s. 1.5) experimentell untersucht. Die Rolle von Myo1 und Myo2 in *U. maydis* ist dagegen unbekannt.

In haploiden Sporidien von *U. maydis* spielt Myo5 eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung und Zellmorphogenese. *myo5*-Deletionsmutanten sind zwar lebensfähig, weisen jedoch ein phänotypisch stark verändertes Wachstum auf (Weber et al, 2003). In Filamenten scheint UmMyo5 für die Aufrechterhaltung der polaren Wachstumsachse erforderlich zu sein und die Wachstumszone zu bestimmen. *Δmyo5*-Hyphen haben einen vergrößerten

Zelldurchmesser, zeigen ein irreguläres, spiralförmiges Wachstumsverhalten, und weisen eine unregelmäßige Chitin-Verteilung entlang der gesamten Hyphe auf (Weber et al, 2003). Das Myo5-GFP Fusionsprotein lokalisiert in Zellen mit kleineren Knospen und in Filamenten an der Zellspitze (Weber et al, 2003) und es konnte für schwache Myo5-GFP Signale anterograde Motilität beobachtet werden (Steinberg, 2007a). Dies weist auf eine Funktion von Myo5 in der apikalen Wachstumsregion und auf eine Rolle in der Anlieferung Membransumgeschlossener Vesikel zur Wachstumszone hin. Demzufolge ist Myosin für das filamentöse Wachstum und die Pathogenität von *U. maydis* essentiell (Schuchardt et al, 2005; Weber et al, 2006).

Neben den beachtlichen Hinweisen auf eine Funktion von Aktin-abhängigen Myosinen während des pilzlichen Wachstums (s. oben), gibt es in Bezug auf ihre Rolle für die pathogene Entwicklung nur wenige Veröffentlichungen (Cui et al, 2009; Madrid et al, 2003; Weber et al, 2006; Weber et al, 2003; Werner et al, 2007).

1.5 Die Bedeutung von Chitinsynthasen für das polare Wachstum bei Pilzen

Das Hyphenwachstum und die Hyphenmorphologie sind abhängig von der Sekretion Zellwand-verändernder Enzyme. Eine Gruppe exozytierter Proteine sind Chitinsynthasen (CHS). Diese Membran-gebundenen Enzyme katalysieren die Synthese von Chitin, dem Hauptbestandteil der pilzlichen Zellwand. Dabei handelt es sich um ein Polymer aus β -1,4-vernetzten N-Acetylglucosaminen, das für die Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität und somit für das Spitzenwachstum und der Hyphenmorphogenese von entscheidender Bedeutung ist. Das Genom von *U. maydis* kodiert für acht CHS (Weber et al., 2006), die in verschiedenen Veröffentlichungen in fünf bis sieben Klassen gruppiert werden (Martin-Urdiroz et al, 2008; Nino-Vega et al, 2000; Roncero, 2002). Die für Chitinsynthasen charakteristische Primärstruktur, bestehend aus einem wenig konservierten hydrophilen N-Terminus, an den sich ein mittlerer neutraler Bereich und ein eher hydrophober C-Terminus anschließen, ist auch in den *U. maydis* CHS vorhanden. Die C-terminale Region enthält stark konservierte Bereiche, die mögliche katalytische Domänen, wie beispielsweise das QRRRW-Motiv, darstellen. Untersuchungen an Chs1p, Chs2p und Chs3p aus *S. cerevisiae* konnten nachweisen, dass diese Regionen für die Aktivität und Funktion von Chitinsynthasen essentiell sind (Cos et al, 1998; Nagahashi et al, 1995a; Nagahashi et al, 1995b; Specht et al, 1996).

1.5.1 Klasse V Chitinsynthasen sind pilzliche Pathogenitätsfaktoren

In den letzten Jahren wurden in fast allen sequenzierten filamentösen Pilzen Chitinsynthasen identifiziert, die an ihrem N-Terminus putative Myosin-Motordomänen enthalten und somit Hybridproteine darstellen (Amnuaykanjanasin & Epstein, 2003; Chigira et al, 2002; Fujiwara et al, 1997; Garcera-Teruel et al, 2004; Liu et al, 2004; Madrid et al, 2003; Muller et al, 2002; Nino-Vega et al, 2000; Park et al, 1999). Für die Klassifizierung dieser Myosin-Chitinsynthasen gibt es je nach Autoren unterschiedliche Auffassungen (Martin-Urdiroz et al, 2008; Roncero, 2002; Takeshita et al, 2002). Entsprechend der strukturellen Eigenschaften der N-terminalen Myosin-Motordomäne (MMD) wurden sie in zwei Unterklassen, die Klassen V bzw. VI, eingeordnet (Garcera-Teruel et al, 2004; Takeshita et al, 2006).

Klasse V CHS sind generelle Pathogenitätsfaktoren, die für die erfolgreiche pilzliche Infektion von Pflanzen, aber auch von Tieren und dem Menschen, eine bedeutende Rolle spielen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass sie für die Virulenz der phytopathogenen Pilze *Fusarium oxysporum* (Madrid et al, 2003), *Colletotrichum graminicola* (Werner et al, 2007) und *Ustilago maydis* (Weber et al, 2006) von entscheidender Bedeutung sind. Klasse V CHS sind auch für die Pathogenese des humanen Krankheitserregers *Wangiella dermatitidis* essentiell (Liu et al. 2004), was darauf hinweist, dass diese Enzyme generelle Virulenzfaktoren sind.

Im Gegensatz zu anderen veröffentlichten Myosin-Chitinsynthase Mutanten (Horiuchi et al, 1999; Madrid et al, 2003; Werner et al, 2007), weisen Deletionsmutanten der Klasse V CHS Mcs1 (Mynosin-Chitinsynthese 1) in *U. maydis*, keine morphologischen Veränderungen beim Hefe-artigen und filamentösen Wachstum auf; Mcs1 ist jedoch für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* in Mais essentiell (Weber et al, 2006). Infektionen mit *mcs1*-Deletionsstämmen zeigen weder Anthocyan- noch Tumorbildung. Stattdessen kommt es direkt nach der Penetration zum Anschwellen intrazellulärer Hyphen und zum Wachstumsarrest (Weber et al, 2006). $\Delta mcs1$ Hyphen können nach der Penetration nicht mehr gerichtet wachsen und weisen demzufolge apolares Wachstum auf, das auf die oberen Epidermiszellen beschränkt ist (Weber et al, 2006). Es ist bereits bekannt, dass Mcs1YFP in der Wachstumsregion von Hyphen und Hefe-artiger Zellen lokalisiert und dort einen Gradienten ausbildet, was auf eine Rolle im Spitzenwachstum hinweist (Weber et al, 2006).

Über den apikalen Transport von CHS und somit den Einfluss molekularer Motoren auf die Anlieferung der Proteine gibt es bisher nur wenige Informationen. Im Modelorganismus *S. cerevisiae* werden CHS durch Vesikel des Golgi-Apparates in einer inaktiven Form zur

Plasmamembran transportiert, um dort in Komplexen gruppiert und durch Kontakt mit vorhandenen Aktivatoren aktiviert zu werden (Latge, 2007). Als Transportmittel für CHS zur wachsenden Hyphenspitze wurden in filamentösen Pilzen kleine (Durchmesser: 40-70 nm), sphärisch geformte Vesikel, so genannte Chitosomen, beschrieben (Bartnicki-Garcia, 2006; Bracker et al, 1976). Der Mechanismus der Anlieferung zum Zellapex und die anschließende Integration in die Plasmamembran ist in filamentösen Pilzen bislang noch ungeklärt (Bartnicki-Garcia, 2006; Riquelme et al, 2007). Einige Arbeiten diskutieren eine Rolle des Mikrotubuli-Cytoskeletts im Langstreckentransport von Chitosomen zur Wachstumszone hin (Bartnicki-Garcia, 2006; Steinberg, 2007a; Takeshita et al, 2005). Im Gegensatz dazu weisen jedoch Arbeiten aus *S. cerevisiae* auf eine Rolle von F-Aktin und assoziierten Myosinen für den Transport der Vesikel hin (Santos & Snyder, 1997). Santos und Snyder konnten zeigen, dass die Polarisierung von Chs3p an kortikale Bereiche unter anderem vom Aktin-Cytoskelett und dem Klasse V Myosin Myo2p abhängt. Weitere Studien in der Bäckerhefe weisen auf eine Rolle des Klasse II Myosins Myo1p in der Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität hin (Rodriguez-Quinones et al, 2008). *myo1*-Deletionsstämme zeigten beispielsweise eine abnormale Zellmorphologie sowie eine fehlgeleitete Chitinverteilung (Rodriguez & Paterson, 1990).

Die Hypothese, dass das Acto-Myosin-System für die Anlieferung von CHS eine Rolle spielt, wird durch die ungewöhnliche Domänenstruktur der Klasse XVII Myosine unterstützt. Diese könnte darauf hinweisen, dass die eigene Myosin-Motordomäne das Enzym zur apikalen Wachstumszone transportiert (Abb. 5 (1); (Abramczyk et al, 2009; Choquer et al, 2004; Fujiwara et al, 1997).

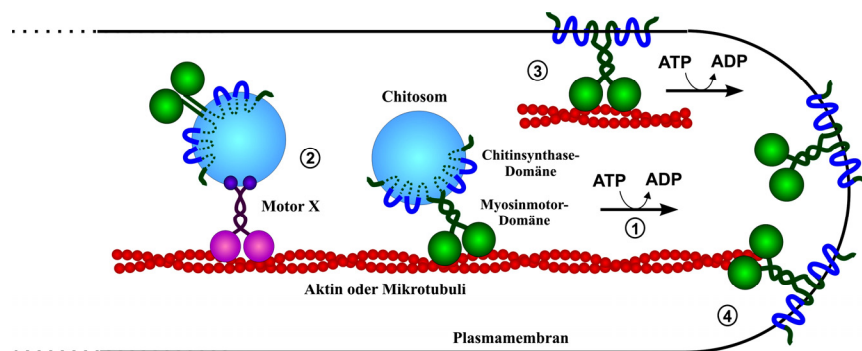


Abb. 5. Mögliche Rollen der Myosin-Motordomäne für die Anlieferung und Lokalisation von Klasse V Chitinsynthasen. (1) Die eigene Myosin-Motordomäne transportiert die Chitinsynthase-Domäne zur apikalen Spitze. (2) Die Anlieferung der Mcs1-beladenen Chitosomen erfolgt Aktin- oder Mikrotubuli-abhängig durch andere molekulare Motoren. (3) Die Motordomäne verankert die Chitinsynthase-Domäne an der Wachstumszone oder spielt in der apikalen Einbindung des Proteins in die Plasmamembran eine Rolle. (4) Die Motordomäne wird dabei zur Fokussierung von Mcs1 an der Hyphenspitze benötigt. (Die Abbildung wurde von G. Steinberg zur Verfügung gestellt.)

Detaillierte Studien bezüglich der Myosin-Motordomäne der Klasse V CHS wurden bereits für CsmA aus *A. nidulans* durchgeführt. *In vitro*-Untersuchungen bestätigten, dass die MMD von CsmA an F-Aktin bindet (Takeshita et al, 2005). Des Weiteren konnte mittels Immunfluoreszenz von mutiertem CsmA gezeigt werden, dass die Aktinbindung für die korrekte Lokalisation an der Hyphenspitze und für das Hyphenwachstum essentiell ist (Takeshita et al, 2005). Beide Ergebnisse unterstützen die Hypothese eines möglichen Transports durch die eigene Motordomäne. Im Gegensatz dazu wurde jedoch weiterhin beschrieben, dass die eigentliche Motor-Aktivität nicht für die Lokalisation und Funktion benötigt wird. Stattdessen wurde die Möglichkeit diskutiert, dass andere Motorproteine, wie Myosine oder Kinesine, die die Klasse V CHS zur Wachstumszone transportieren (Abb. 5, (2)). Die Motordomäne könnte dann eher lokalen Funktionen, wie der Verankerung oder Fokussierung des Enzyms an der Hyphenspitze, dienen (Abb. 5, (3, 4); (Takeshita et al, 2005). Sowohl der Anlieferungsprozess, als auch die genaue Rolle der MMD der Klasse V CHS blieben bisher ungeklärt.

1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

In früheren Arbeiten konnte bereits die polar lokalisierende Klasse V Chitinsynthase Mcs1 aus *U. maydis* als Virulenzfaktor für die *Zea mays* Infektion identifiziert werden (Weber et al, 2006). Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis über den zielgerichteten Anlieferungsmechanismus dieser Myosin-Chitinsynthasen zur apikalen Wachstumsregion zu erlangen. Dabei sollte besonders der Transportmechanismus, durch den Mcs1 die polare Wachstumsregion erreicht untersucht, und die Rolle der beiden Domänen in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* ermittelt, werden. Für CsmA, der Klasse V CHS aus *A. nidulans*, wurde die Rolle Mikrotubuli-abhängiger Motoren für den Transport diskutiert (Takeshita et al, 2005). Mikrotubuli scheinen dagegen für die polare Lokalisation von Chs5p von *W. dermatitidis* und Chs3p aus *S. cerevisiae* keine Rolle zu spielen (Abramczyk et al, 2009; Santos & Snyder, 1997). Da sowohl der Anlieferungsprozess, als auch die genaue Rolle der Motordomäne von Mcs1 in *U. maydis* bisher ungeklärt bzw. widersprüchlich beschrieben sind, sollten die am Transport beteiligten, molekularen Motoren identifiziert werden. Dafür sollte die molekulare Domänenstruktur dieses Klasse V CHS analysiert und der Einfluss der Myosin-Motordomäne und der Chitinsynthase-Domäne für die polare Lokalisation sowie die Pathogenität geklärt werden.

2 ERGEBNISSE

2.1 Mcs1 ist eine Klasse V Chitinsynthase

Für die Klassifizierung von Myosin-Chitinsynthasen gibt es je nach Autoren unterschiedliche Auffassungen (Martin-Urdiroz et al, 2008; Roncero, 2002; Takeshita et al, 2002). Entsprechend der strukturellen Eigenschaften der N-terminalen Myosin-Motordomäne (MMD) wurden sie in zwei Unterklassen, die Klassen V bzw. VI, eingeordnet (Abb. 6; (Garcera-Teruel et al, 2004; Takeshita et al, 2006).

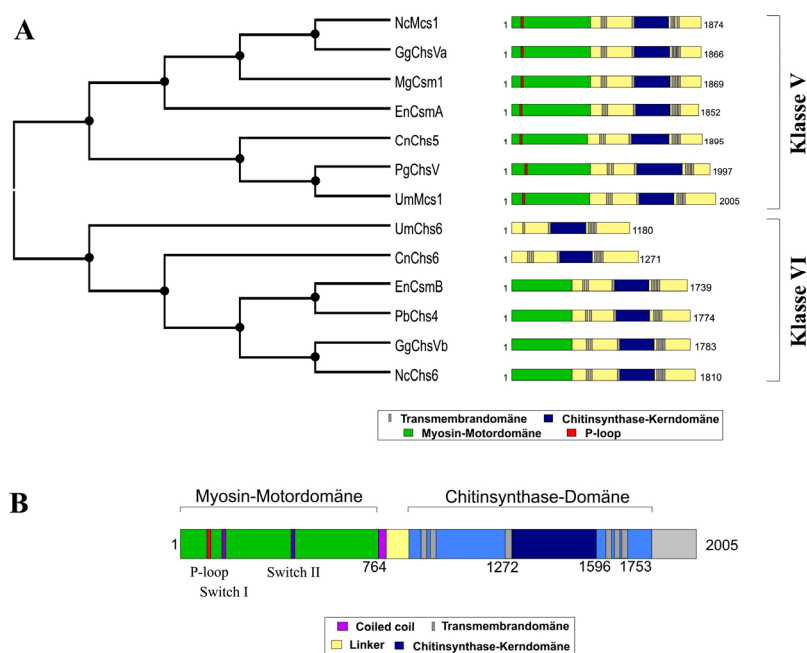


Abb. 6. Aminosäure-Sequenzvergleiche und Domänen-Organisation von Klasse V und VI Chitinsynthasen und Mcs1. (A) Das Genom von *U. maydis* kodiert jeweils für eine Klasse V und eine Klasse VI Chitinsynthase (CHS). Der Stammbaum basiert auf einem Sequenzvergleich der Volllänge Proteine von Klasse V und VI CHS verschiedener Asco- und Basidiomyceten. Die Domänenanalyse wurde mit Hilfe des SMART-Servers durchgeführt. En: *Emericella nidulans*; Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*; Nc: *Neurospora crassa*; Um: *Ustilago maydis*; Cn: *Cryptococcus neoformans*; Mg: *Magnaporthe grisea*; Gg: *Glomerella graminicola*; Pg: *Puccinia graminis*. Accession Nummern: EnCsmB (AB230981), PbChs4 (AF107624), UmChs6 (AF030554), CnChs6 (XM_566840), GgChsVb (AAL55424), NcChs6 (EAA27095), EnCsmA (AB000125), UmMcs1 (XP_759351), PgChsV (ABB70410), CnChs5 (XP_571494), MgCsm1 (AB018251), GgChsVa (AY052547), NcChs5 (EAA27097). Bootstrapwerte: geschlossener Kreis 80-100. (B) Domänenorganisation von *U. maydis* Mcs1. Die genomische Sequenz kodiert für eine MMD (As 1-764), eine putative Dimerisierungsregion (Coiled coil As 764-795) und der Chitinsynthase-Domäne. (Die Abbildung wurde in Anlehnung an Takeshita et al (2006) (A) und I. Weber (Doktorarbeit, 2005) (B) erstellt.)

Die MMD der Klasse V Chitinsynthasen (CHS) sind bis zu 800 Aminosäuren lang und beinhalten alle wichtigen Regionen sowie die ATP-bindenden Motive, die für die Funktionalität von Myosinen eine Rolle spielen (Abb. 6A; (Chigira et al, 2002; Nino-Vega et al, 2004). Die MMD der Klasse VI CHS sind hingegen verkürzt und nur 600 bis 700 Aminosäuren lang. Des Weiteren fehlen die ATP-bindenden Motive, wie der P-loop (Abb.

6A; (Chigira et al, 2002; Nino-Vega et al, 2004) und die Switch I- und Switch II-Regionen, die in allen Myosinen konserviert und für die Myosinmotor-Funktion von unterschiedlicher Bedeutung sind (Shimada et al, 1997). Klasse VI CHS von Basidiomyceten fehlt an ihrem N-Terminus die MMD (Garcera-Teruel et al, 2004).

Das Genom von *U. maydis* kodiert, wie die Genome aller anderen bisher untersuchten filamentösen Pilze, für zwei Myosin-Chitinsynthasen, *chs6* und *mcs1* (Abb. 6A; (Garcera-Teruel et al, 2004; Weber et al, 2006). *Chs6* ist eine Klasse VI CHS, die wie bei anderen sequenzierten Basidiomyceten keine Motordomäne mehr besitzt. *Mcs1* (Mynosin-Chitinsynthase 1) wird aufgrund ihrer Domänenstruktur der Klasse V Chitinsynthasen zugeordnet und ist ein Fusionsprotein, das aus einer N-terminalen Myosin-Motordomäne (MMD) und einer C-terminalen Chitinsynthase-Domäne besteht (Abb. 6B). Die genomische Sequenz kodiert für eine MMD (As 1-764), eine putative Dimerisierungsregion („Coiled coil“ As 764-795) und eine Chitinsynthase-Domäne (As 879-1753 mit der CHS-Kernregion As 1272-1596). Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die konservierten Regionen, die für die Myosin-Aktivität eine Rolle spielen, wie der P-loop (As 108-115), die Switch I-Region (As 162-167) und die Switch II-Region (As 384-389), auch in *Mcs1* zu finden sind (Abb. 6B). Im C-terminalen Bereich dieses Proteins befinden sich alle wichtigen Domänen, die für die Chitinsynthase-Aktivität von Bedeutung sind. Die in *Chs2* von *S. cerevisiae* vorkommenden funktionell essentiellen Sequenzen EDR und QRRRW sind auch in *Mcs1* konserviert (Ford et al, 1996; Nagahashi et al, 1995b).

2.2 Sequenzanalyse und strukturelle Modellierung der Myosin-Motordomäne

Um zu untersuchen, ob sich die *Mcs1*-Motordomäne theoretisch wie ein sich bewegendes Myosin-Motorkopf verhalten könnte, wurden Sequenzanalysen und eine detaillierte Strukturanalyse durchgeführt. Entsprechend der Hypothese, dass *Mcs1* durch seine eigene Motor-Aktivität zur Hyphenspitze gelangen könnte, wurden signifikante Primärsequenz-Ähnlichkeiten zu Motordomänen anderer unkonventioneller Myosine erwartet. Die *Mcs1*-Motordomäne teilt nur 26% Sequenzidentität mit *Myo5* aus *U. maydis* und 27% Sequenzidentität mit humanem *MyoIXb*. Jedoch konnten alle funktionellen Domänen und Motive, die in anderen Myosinen konserviert sind auch in der *Mcs1* MMD ermittelt werden. In der *Mcs1*-„neck“-Region befindet sich ein für Myosine typisches IQ-Motiv (As 721-741; Dr. J. Molloy, pers. Mitteilung). Dies sind Calmodulin-bindende Regionen, die bei der Calcium-abhängigen Regulation eine wichtige Rolle spielen und als so genannte „lever“-Arme für die schrittweise Bewegung an den Aktin-Filamenten von entscheidender Bedeutung

sind (Kohler et al, 2003; Purcell et al, 2002; Uyeda et al, 1996). Des Weiteren enthält die Mcs1-Sequenz im Bereich des „Linkers“ eine kurze Coiled coil Region (As 764-795; Coils2: $P>0.95$), die für die Dimerisierung eine Rolle spielen könnte und generell wichtig für prozessive Bewegung in Myosinen ist (Hodges et al, 2008; Mehta et al, 1999).

Um Ähnlichkeiten zu ermitteln, wurden in einer ClustalW2-Sequenzanalyse (für weitere Details siehe Material und Methoden) verschiedene Motordomänen funktionell charakterisierter Myosine untersucht und mit der Mcs1-Proteinsequenz verglichen. Dabei wurden durch den SMART-Server (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) als Myosin-Motordomänen annotierte Sequenzen verwendet und ausschließlich Myosine einbezogen, von denen man bereits eine Aktin-abhängige Bewegung nachweisen konnte. Weiterhin wurde darauf geachtet, eine möglichst große Bandbreite von Myosinen verschiedenster Organismen und Myosin-Klassen zu verwenden (Tabelle 1). Die Mcs1-Sequenz ähnelt den Primärsequenzen ausgewählter Myosine über die gesamte Domänenlänge. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass der Mcs1-Motorkopf die Tertiärstruktur einer Myosin-Motordomäne annehmen könnte. Jedoch konnten auch mehrere Sequenzinsertionen und ausgedehnte „loops“, wie z. B. As 534-550 und As 574-639, die besonders lange Insertionen bilden, identifiziert werden.

Tabelle 1. Für den Sequenzvergleich verwendete Myosine.

Organismus	Bezeichnung	Klasse	Accession	Referenz
<i>Mus musculus</i>	MmMyoVI	VI	NM_001039546	(Nishikawa et al, 2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScMyo2	V	CAA99646	(Reck-Peterson et al, 2001)
<i>Chara corallina</i>	CcMyoXI	XI	BAB03273	(Ito et al, 2003)
<i>Mus musculus</i>	MmMyoVa	V	Q99104	(Mehta et al, 1999)
<i>Homo sapiens</i>	HsMyoIXb	IX	BAE06079	(Post et al, 2002)
<i>Dictyostelium discoideum</i>	DdMyoIE	I	XP_636580	(Dürrwang et al, 2006)
<i>Ustilago maydis</i>	UmMyoV	V	AJ577236	(Weber et al, 2003)
<i>Ustilago maydis</i>	UmMcs1	XVII	XP_759351	

Ein Proteinsequenz-Vergleich der Myosine (ca. 750 As), bei denen eine Aktin-abhängige Bewegung experimentell gezeigt werden konnte (Auswahl und Referenzen s. Tabelle 1), ergab, dass diese Motordomänen 100 identische Aminosäure teilen. Jedoch wurden nur 66 dieser identischen Aminosäuren in der Mcs1-Motordomäne gefunden. Es konnten zwei

spezifische Regionen, in denen Mutationen ansonsten konservierter Aminosäurereste akkumulieren, identifiziert werden: der P-loop und die Switch II-Region (Abb. 8D). Der P-loop spielt eine entscheidende Rolle in der ADP- und ATP-Bindung (Coureux et al, 2004; Sasaki & Sutoh, 1998; Yount et al, 1995). Die Switch II-Region ist teilweise ebenfalls in die ATP-Bindung involviert, spielt jedoch auch eine Rolle bei der Signalübertragung des Nukleotid-Bindungszustandes auf den Rest des Moleküls.

Basierend auf einem ClustalW2-Sequenzvergleich wurde anhand der veröffentlichten Kristallstrukturen (Auswahl und Referenzen s. Tabelle 2) von GgSkMmyo und GgMyo5a von *Gallus gallus*, Muskelmyosin LpMyoS1 von *Loligo pealei* und DdMyoII aus *Dictyostelium discoideum* in Zusammenarbeit mit Dr. Nicolas Harmer an der Universität Exeter ein Strukturmodell der Mcs1-Motordomäne im "post-rigor" Zustand modelliert (Abb. 8).

Tabelle 2. Für die Modellierung verwendete Kristallstrukturen.

Organismus	Bezeichnung	Accession: Protein	PDB ID	Referenz: Struktur	Referenz: Motilität
<i>Dictyostelium discoideum</i>	DdMyoII	P08799	1MMD	(Fisher et al, 1995)	(Murphy et al, 2001)
<i>Gallus gallus</i>	GgMyoVa	NP_990631	1W7J	(Coureux et al, 2004)	(Dunn & Spudich, 2007)
<i>Gallus gallus</i>	GgSkMmyo	P13538	2MYS	(Rayment et al, 1993)	(Umemoto & Sellers, 1990)
<i>Loligo pealei</i>	LpMyoS1	AAC24207	2OY6	(Yang et al, 2007)	

Wie schon aus dem Sequenzvergleich ersichtlich wurde, enthielt das Strukturmodell, das mit Magnesium, ADP und BeF₄ (ahmt die Lage des γ -Phosphats nach) im aktiven Zentrum erstellt wurde, alle bedeutenden Elemente der Myosin-Sekundärstruktur (Abb. 8C). Trotz der vielen Aminosäure-Austausche im P-loop und den anderen bedeutenden interagierenden Seitenketten, bleibt ein Großteil der funktionellen Elemente, die für die ATP-Bindung erforderlich sind, erhalten. Des Weiteren wurden lange Insertionen zwischen den Aminosäureresten 534-550 und 574-639 aus dem Modell ersichtlich.

NcMcs1	570	ALHTV V HPQ E KT T VMQ A SVSS K PM R TP S VLS-	601
GgChsVa	572	ALKT V THPK E RST V MQ A TISS K PT R AP S VMS R	604
MgCsm1	571	ALHT V THPQ E RT T VMQ A SVSS K PM R AP S VMS R	603
EnCsmA	578	ALQT V AHP K EKT A IMQ A QVSS K PL R MP S MARR	610
UmMcs1	565	VLKTQ S HP K NDQ T IV A AQ Q SV K PM R AP S TR R P	596
CnChs5	542	NIAMQ T HP R SD S TI V A A Q Q SV R P V AP S TR R K	573
PgChsV	619	NLT T TT T HP M SE K TI V A A Q Q LQ R PM R AP S TR R K	640

Abb. 7. Sequenzvergleich des erweiterten „loops“ verschiedener filamentöser Pilze. Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz des erweiterten „loops“ von Klasse V und VI CHS verschiedener Asco- und Basidiomyceten. Für Abkürzungen und Accessionnummern vgl. Abb. 6. Blau: Aminosäuren, die sowohl in Asco- und Basidiomyceten identisch sind; Rot: Zusätzliche konservierte Aminosäuren in Basidiomyceten.

Diese sind als zwei ausgedehnte „loops“ erkennbar, die sich jedoch in Regionen befinden, die auch in anderen Myosinen wenig konserviert sind (Abb. 8B) und in aktiven Myosinen eventuell einen Teil der Aktin-Bindestelle bilden. Das Vorhandensein dieser ausgedehnten „loops“ deutet auf eine funktionelle Rolle hin, die man anhand des Modells nicht bestimmen kann. Detaillierte Sequenzanalysen des erweiterten „loops“ verschiedener filamentöser Pilze zeigten, dass Teile des zweiten „loops“ in Mcs1 hohe Aminosäure-Sequenzähnlichkeiten zu anderen Klasse V CHS, insbesondere jedoch zu anderen Basidiomyceten, aufweisen (Abb. 7). Dies könnte auf konservierte Myosin XVII-spezifische Funktionen hinweisen.

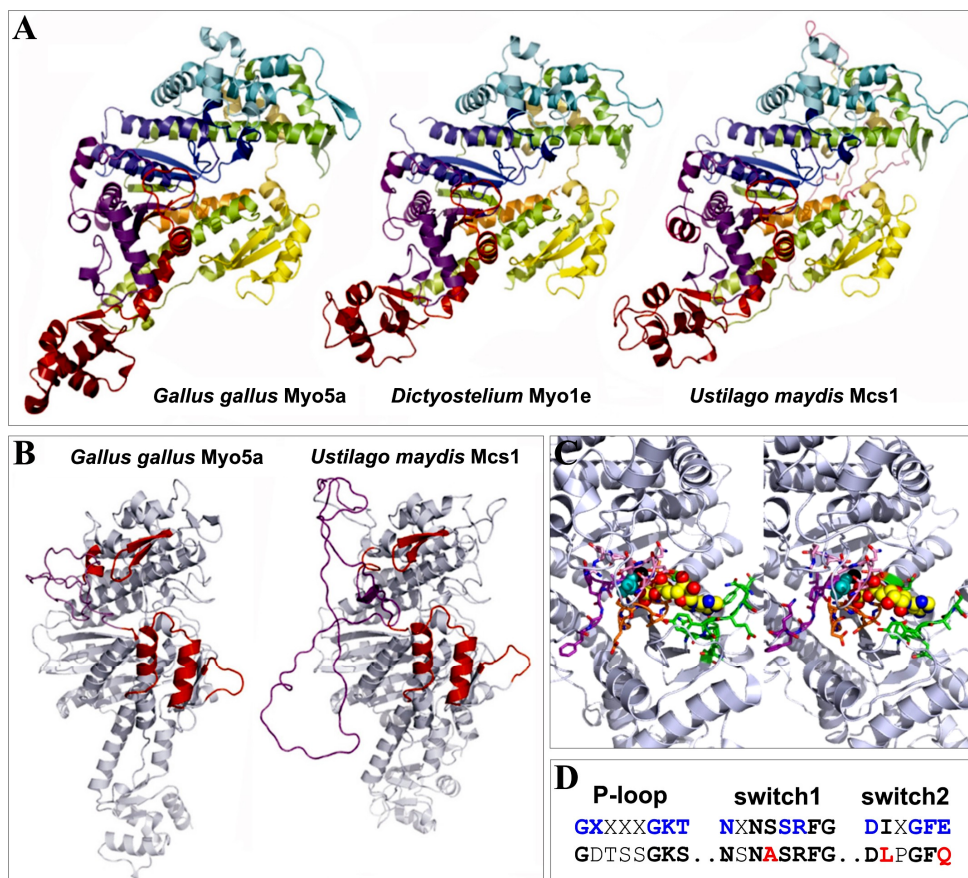


Abb. 8. Strukturelle Modellierung der Myosin-Motordomäne. (A) Die Struktur der N-terminalen Domäne von *U. maydis* Mcs1 wurde unter Verwendung der bekannten Strukturen des *G. gallus* Skelettmuskel-Myosins und Myosin 5a, des Tintenfisch Myosins und Myosin II von *D. discoideum* als Vorlagen, modelliert. Ein Vergleich der modellierten Mcs1-Struktur mit der Struktur von Myosin 5a und *Dictyostelium* Myosin II demonstriert, dass alle wichtigen sekundären strukturellen Elemente beibehalten sind. (B) Die Mcs1-Sequenz beinhaltet zwei große „loops“ und einen verlängerten „loop“ (lila), die in anderen Myosinen nicht konserviert sind. (C) Konservierung der ATP-bindenden Tasche. (Stickstoffatome: blau; Sauerstoffatome: rot; Magnesium Ion: grau; BeF₄: cyan; ADP-Kohlenstoffrückgrad: gelb; P-loop: orange; switch I: pink; switch II: lila). (D) Sequenzvergleich der ATP-bindenden „loops“; oben: Konsensus-Sequenz; unten: Mcs1-Sequenz; blau: bekannte Minimalsequenz bzw. As, von denen Funktionalität nachwiesen werden konnte. (Die strukturelle Modell-Analyse wurde in Kollaboration mit Dr. Nicolas Harmer an der Universität Exeter durchgeführt.)

2.3 Funktionelle Untersuchungen zur Myosinmotor- und Chitinsynthase-Domäne

Die Sequenzanalyse und die Modellierung des Mcs1-Strukturmodells unterstützen die Hypothese, dass sich die Myosin-Motordomäne wie ein bewegendes Myosin verhält und die eigene Chitinsynthase-Domäne zur apikalen Wachstumszone transportieren könnte.

Um zu testen, ob die konservierten Bereiche wichtig für die Funktion des Proteins sind, wurde die SG200 Δ mcs1 Deletionsmutante mit *mcs1*-Versionen komplementiert, die für mutierte Bereiche des N- bzw. des C-Terminus kodieren (Abb. 9A). Zudem wurden Versionen hergestellt, in der die einzelnen Domänen sowie darüber hinausgehende zentrale Bereiche des Proteins deletiert wurden.

Als interne Kontrolle für Lokalisierung, Pathogenität und Bewegung wurde die Volllängeensequenz der Chitin-Synthase, fusioniert an eine dreifache Kopie des *gfp*-Gens, kloniert (G₃Mcs1). Um die Rolle der Motordomäne im Hinblick auf die Pathogenität von *U. maydis* sowie die Lokalisierung des Proteins untersuchen zu können, wurde die Motordomäne bis auf die ersten 150 Basenpaare deletiert und nur die Sequenz, die für die Chitinsynthase-Domäne (incl. Linkerregion, G₃Mcs1 Δ MM) kodiert, exprimiert.

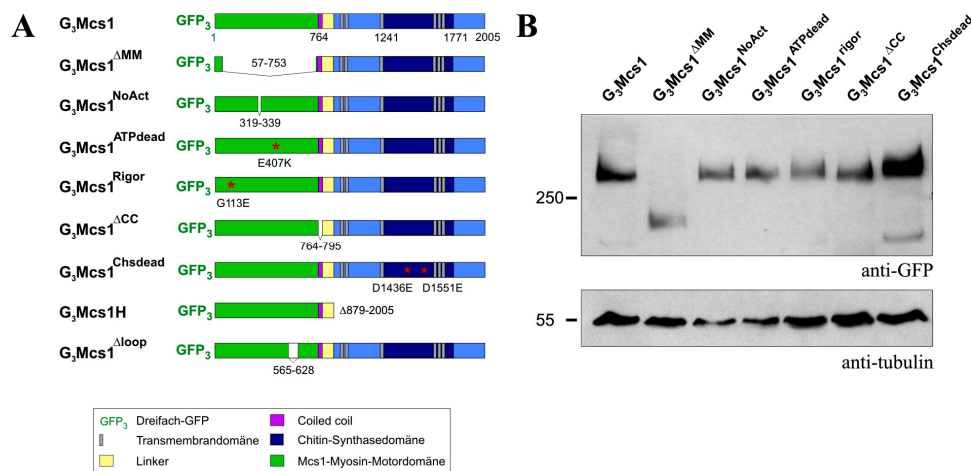


Abb. 9. Konstrukte zur funktionellen Mcs1-Analyse und dessen gleichmäßige Proteinexpression. (A) Graphische Darstellung der Mcs1-Komplementations-Proteine, die für Lokalisationsstudien und der funktionellen Mcs1-Charakterisierung in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Domänenanalyse erfolgte durch den SMART-Server (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). (B) Repräsentativer Western-Blot zur Darstellung einer gleichmäßigen Expression der in (A) dargestellten Proteine. Erwartete Proteingrößen: G₃Mcs1 (305 kDa), G₃Mcs1 Δ MM (227 kDa), G₃Mcs1^{NoAct} (303 kDa), G₃Mcs1^{ATPdead} (305 kDa), G₃Mcs1^{Rigor} (305 kDa), G₃Mcs1 Δ CC (303 kDa) und G₃Mcs1^{Chsdead} (305 kDa). (Die Abbildung in Zusammenarbeit mit G. Steinberg erstellt.)

Die Bindung an F-Aktin ist eine essentielle Funktion, die bei allen Myosinen stark konserviert ist (Ruppel & Spudich, 1996). Durch Modellierung der Motordomäne und Sequenzvergleiche konnte eine putative Aktin-Bindeschleife, der so genannte „Myopathy loop“ identifiziert werden (vgl. 2.2). Dieser „loop“ (As 319-339; Abb. 9A), von dem in *Dictyostelium* Myosin II

und *A. nidulans* CsmA ein Einfluss auf die Aktinbindung gezeigt werden konnte (Sasaki et al, 1999; Takeshita et al, 2005), wurde in *U. maydis* Mcs1 deletiert ($G_3Mcs1^{\Delta NoAct}$, Abb. 9A). Die Rolle von ATPase-Aktivität und ATP-Bindung sollte durch das Einführen von „ATPdead“ und „Rigor“-Mutationen ermittelt werden. Mutationen in Regionen, wie dem P-loop, können theoretisch die ATPase-Aktivität und die ATP-Bindung unterbinden (Sasaki & Sutoh, 1998). Daher wurde analog zu Takeshita et al. (2005) eine Mutation im P-loop ($G113E$; G_3Mcs1^{Rigor} ; Abb. 9A) eingeführt. Die ATPase-Aktivität wurde durch Einfügen der $E407K$ -Mutation (G_3Mcs1^{E407K} , Abb. 9A) untersucht. Eine analoge Mutation in MyoA von *A. nidulans* und MyoII von *D. discoideum* zeigten eine signifikante Reduktion der ATPase-Aktivität (Liu et al, 2001; Ruppel & Spudich, 1996). Um die Rolle der Chitinsynthase-Domäne untersuchen zu können, wurden in das konservierte Motiv 1 und das EDRXL-Motiv Aminosäure-Austausche eingeführt, von denen in Chs2 aus *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte, dass die Chitinsynthase-Aktivität eliminiert war (Nagahashi et al, 1995b).

Die Myo5-Motordomäne von *U. maydis* ist in der Lage, auch ohne die „tail“-Region an der Spitze zu lokalisieren (nicht gezeigt). Ob die polare Mcs1-Akkumulation ohne die Chitinsynthase-Domäne erfolgen kann, wurde durch die alleinige Expression der Motordomäne getestet (G_3Mcs1H). Des Weiteren wurde der, durch die Modellierung identifizierte, verlängerte „loop“ in der Nähe der Aktin-bindenden Region untersucht und dazu die Aminosäuren 565 bis 628 deletiert ($G_3Mcs1^{\Delta loop}$).

Die Komplementation des Pathogenitätsdefekts der Deletionsmutante wurde durch die Expression der beschriebenen Konstrukte unter dem nativen *mcs1*-Promotor im solopathogenen SG200 $\Delta mcs1$ -Hintergrund (Weber et al, 2006) untersucht. Für Lokalisationsstudien wurden, wie in Abb. 9 dargestellt, die *mcs1*-Mutationskonstrukte am 5'-Ende mit einer dreifachen Kopie des *gfp*-Gens fusioniert und im *ip*-Lokus in *mcs1*-Deletionsmutanten exprimiert. Die einfache Integration der jeweiligen Konstrukte im *ip*-Lokus (Loubradou et al, 2001) wurde durch Southern-Blot Analysen verifiziert. Ein vergleichbares Expressionslevel der einzelnen Mutationsstämme wurde durch Western-Blot Analysen nachgewiesen (Abb. 9B). Aufgrund der Größe des Membranproteins (~305 kDa) war die Analyse zur Proteinexpression technisch schwer durchführbar. Jedoch mehrere Versuchsreplikate zeigten, dass das Expressionsniveau der verschiedenen Proteine im Mittel nicht signifikant unterschiedlich ist (ANOVA-Test: $P=0,54$). Auch G_3Mcs1H und $G_3Mcs1^{\Delta loop}$ werden in vergleichbaren Mengen wie die G_3Mcs1 -Komplementationskontrolle produziert (nicht gezeigt). Daher kann ausgeschlossen werden, dass funktionelle Unterschiede nicht auf veränderte Expressionsstärken zurückzuführen sind.

2.3.1 Saphrophytisches Wachstum der Deletions- und Punktmutationsstämme

In axenischer Kultur konnten für SG200 Δ mcs1 keine Morphologieveränderungen und keine Veränderungen in der Geschwindigkeit des hefeartigen Wachstums im Vergleich zum Ausgangsstamm SG200 festgestellt werden (Weber et al, 2006). Auch bezüglich des Wachstums sowie der Koloniemorphologie auf Minimal- und Vollmedienplatten zeigte SG200 Δ mcs1 keine Unterschiede zu SG200 (Weber et al, 2006).

Um die Bedeutung der Mcs1-Motordomäne für das saprophytische Wachstum unter ausgewählten Stressbedingungen zu testen, wurde die Entwicklung des *mcs1*-Deletionsstammes sowie der Motordomänen Deletions- und Mutationsstämme auf verschiedenen Stress-induzierenden Medien untersucht (Abb. 10). Die getesteten Substanzen dienten hauptsächlich der Induktion von oxidativem Stress (H_2O_2) und Zellwandstress (Calcofluor, Kongorot; (Mrsa & Tanner, 1999; van der Vaart et al, 1995). Substanzen wie NaCl und Sorbitol, die osmotischen Stress induzieren, zeigten keinen Effekt auf das Wachstum der untersuchten Stämme (nicht gezeigt).

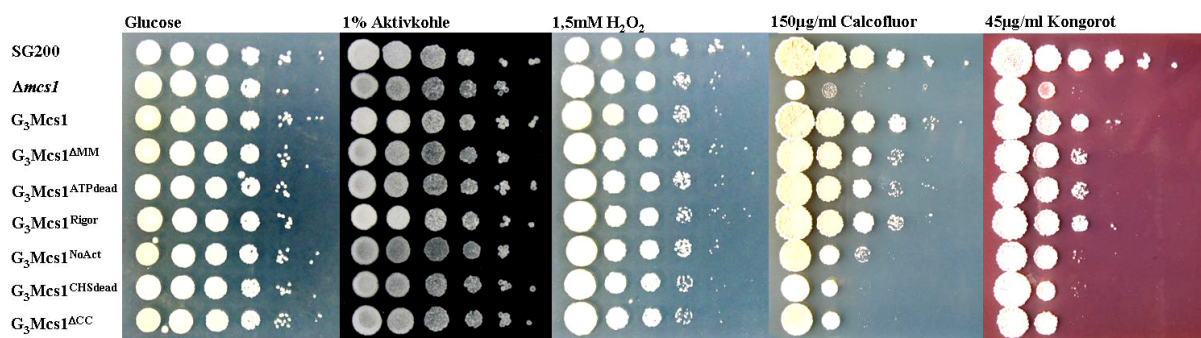


Abb. 10. Filamentöses Wachstum und Stresssensitivität der Mcs1-Deletions- und Punktmutationsstämme. Die Glukoseplatte diente als Wachstumskontrolle ohne Zusätze. Bei 1% Aktivkohle handelte es sich um PD-Platten, die zur Induktion von Filamenten mit Aktivkohle versehen wurden. Für die Sensitivitätstests verwendetes CM-Glukose-Medium wurde mit den entsprechenden Substanzen versetzt. Die aufgeführten Stämme wurden in 10er-Verdünnungen auf die Stresssubstanz-haltigen Medien sowie PD-Aktivkohleplatten getropft.

Bezüglich der Differenzierung von Filamenten auf Aktivkohle-haltigen Platten zeigten SG200G₃Mcs1, SG200 Δ mcs1 und die *mcs1*-Mutationsstämme keine Veränderungen gegenüber dem Ausgangsstamm SG200 (Abb. 10). Auch auf oxidativen Stress-induzierendem Medium (H_2O_2) wurde kein verändertes Wachstum der Mutanten beobachtet. Wurden jedoch Substanzen eingesetzt, die Zellwandstress induzieren (Calcofluor und Kongorot), war bei SG200 Δ mcs1 und den *mcs1*-Mutationsstämmen eine deutliche Wachstumsverminderung zu erkennen (Abb. 10). Besonders die Stämme SG200 Δ mcs1, SG200G₃Mcs1^{CHSdead} und SG200G₃Mcs1^{ACC} zeigten eine signifikant reduzierte Toleranz im Vergleich zu SG200 und der Komplementationskontrolle SG200G₃Mcs1. Eine starke Wachstumsreduktion konnte

auch für SG200G₃Mcs1^{NoAct} beobachtet werden. Die Stämme SG200G₃Mcs1^{ΔMM}, SG200G₃Mcs1^{ATPdead} und SG200G₃Mcs1^{Rigor} zeigten lediglich einen leichten Wachstumsphänotyp auf diesen Medien. Hierbei ist anzumerken, dass das Wachstum des Kontrollstammes SG200G₃Mcs1 in Anwesenheit von Kongorot im Vergleich zu SG200 ebenfalls leicht beeinträchtigt ist.

2.3.2 Die Rolle der Motor- und Chitinsynthase-Domäne für die Pathogenität

Wie schon beschrieben, ist Mcs1 für die reguläre pathogene Entwicklung von *U. maydis* in *Zea mays* essentiell (Weber et al, 2006). Um sowohl die Rolle der Chitinsynthase- als auch der Myosin-Motordomäne von Mcs1 für die Pathogenität zu untersuchen, wurden Infektionstests mit den in 2.3 beschriebenen, mit *mcsI*-Mutationsallelen komplementierten Stämmen, durchgeführt.

Spritzinfektionen sieben bis acht Tage alter Maispflanzen mit dem solopathogenen Ausgangsstamm SG200 resultierten in einer Tumorrates von ca. 70-80%, die in den meisten Fällen mit Anthozyanbildung in der infizierten Region einherging. Im Gegensatz dazu wiesen Maispflanzen nach Infektion mit SG200Δ*mcs1* keinerlei Tumor- oder Anthozyanbildung auf (Abb. 11 und Abb. 12; (Weber et al, 2006)). Diese Pflanzen prägten lediglich leichte Nekrosen aus (Abb. 12).

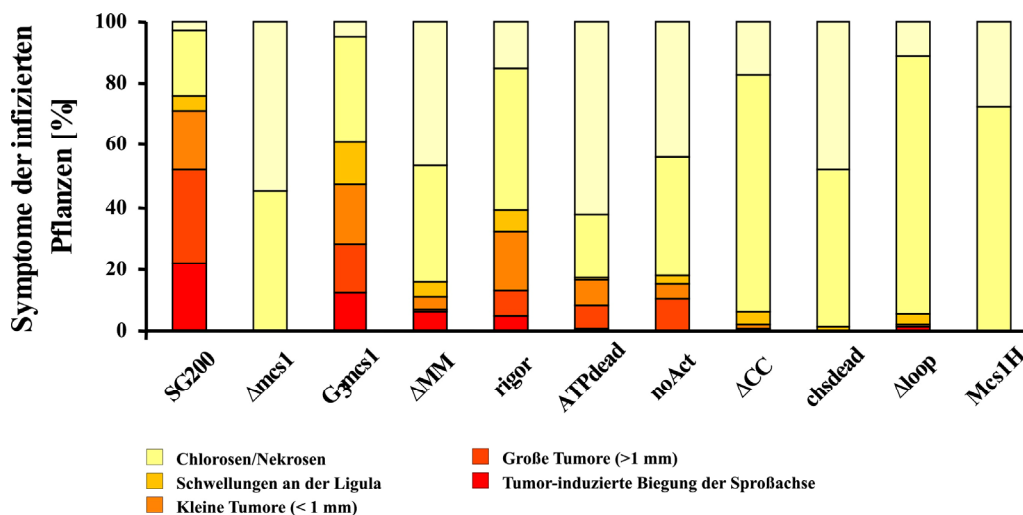


Abb. 11. Virulenz der Mutationsstämme im Vergleich zu SG200 und SG200G₃Mcs1. Dargestellt ist die Virulenz der Komplementationsstämme im Vergleich zu SG200 und SG200G₃Mcs1. Angegeben sind die Boniturdaten (Kämper *et al.*, 2006) zwölf Tage nach Infektion, die in drei bis acht unabhängigen Infektionen mit jeweils 15-39 Pflanzen pro Experiment generiert wurden und Mittelwerte darstellen. Alle Stämme sind Einzelkopieinsertionen des jeweiligen Plasmides im *ip*-Lokus.

Infektionen mit dem Kontrollstamm SG200G₃Mcs1 zeigten eine, im Vergleich zu SG200, geringfügig reduzierte Tumorrates von ca. 60-70%. Die typischen Symptome einer *U. maydis* Infektion, d. h. Tumor- und Anthozyanbildung konnten jedoch beobachtet werden. Daraus

wurde gefolgert, dass das Volllängen-GFP-Mcs1-Fusionskonstrukt funktional ist und den Deletionsphänotyp komplementiert (Abb. 11 und Abb. 12). Spritzinfektion mit den Mcs1-Mutationsstämmen zeigten deutlich, dass sowohl die Chitinsynthase- als auch die Myosinmotor-Domäne für die Pathogenität eine entscheidende, jedoch unterschiedlich gewichtige Rolle spielen. Infektionen mit SG200G₃Mcs1^{Chsdead} und SG200G₃Mcs1H, bei denen die Chitinsynthase-Domäne mutiert bzw. deletiert worden war, verhielten sich wie der *mcs1*-Deletionsstamm. Die Motordomäne-Mutanten konnten den apathogenen SG200Δ*mcs1* Phänotyp hingegen teilweise komplementieren. Nach Infektion mit den Stämmen SG200G₃Mcs1^{ΔCC} und SG200G₃Mcs1^{Δloop} konnten nur gelegentlich kleinere Tumore und Schwellungen an der Ligula beobachtet werden. Die Stämme SG200G₃Mcs1^{ΔMM}, SG200G₃Mcs1^{ATPdead} und SG200G₃Mcs1^{NoAct} wiesen einen intermediären Phänotyp auf, bei dem lediglich eine Tumorrage von ca. 15% erreicht wurde. Für den Stamm SG200G₃Mcs1^{Rigor} wurde dagegen eine Tumorrage von bis zu 40% beobachtet (Abb. 11).

Makroskopisch waren nach Infektion mit SG200Δ*mcs1* und den untersuchten Motordomänen-Mutanten keine oder sehr vereinzelte Virulenzsymptome in Maispflanzen erkennbar (Abb. 12).

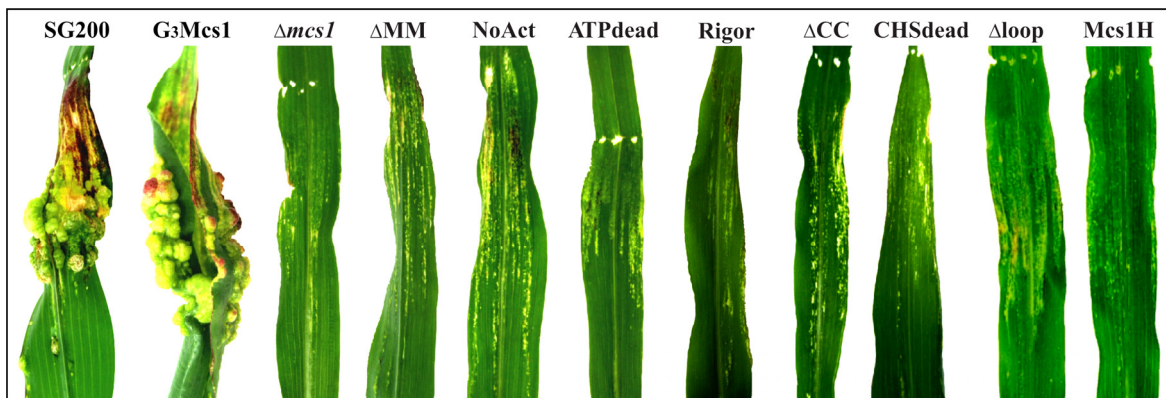


Abb. 12. Symptomausprägung nach Infektion von Maispflanzen mit Mutationsstämmen im Vergleich zu SG200 und G₃Mcs1. Dargestellt ist pro Deletions- bzw. Punktmutationsstamm je ein infiziertes Maisblatt mit typischen Symptomen. Bei SG200 und G₃Mcs1 erkennt man typische Symptome, wie Tumor- und Anthocyanbildung. Die Mutationsstämmen zeigen kollabiertes Pflanzengewebe, stark reduzierte Tumorbildung und kaum Anthocyanbildung auf. Die glatte Oberflächenstruktur der Maisblätter geht in diesen Bereichen verloren und stattdessen sind eingefallene Gewebestrukturen, die teilweise zur Bildung von nekrotischen Läsionen führte, erkennbar. (Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit G. Steinberg erstellt.)

Lediglich leichte Chlorosen unterhalb der Infektionseinstiche konnten ausgemacht werden. Etwa zwei bis drei Tage nach der Infektion wurde zudem im Vergleich zu den Kontrollinfektionen in Infektionen mit SG200Δ*mcs1*, SG200G₃Mcs1^{Chsdead}, SG200G₃Mcs1^{ΔCC}, SG200G₃Mcs1^{Δloop} und SG200G₃Mcs1H infizierten Bereichen zunehmend leichte Nekrosen in Form kollabierter Pflanzenzellen sowie selten größere, lochförmige Läsionen, beobachtet (Abb. 12). Die Pflanzenblätter verloren in diesen Bereichen

ihre glatte Oberflächenstruktur und wiesen eine eingefallene Gewebestruktur auf. Infektionen mit den Stämmen SG200G₃Mcs1^{ΔMM}, SG200G₃Mcs1^{ATPdead}, SG200G₃Mcs1^{NoAct} und SG200G₃Mcs1^{Rigor} führten, wie nach Infektion mit den Stämmen SG200 und SG200G₃Mcs1, zu Anthocyanbildung. Diese ging oft mit Tumorbildung einher.

2.3.3 Mikroskopische Charakterisierung des Infektionsverlaufes

Um das biotrophe Wachstum der Deletions- und Punktmutationsmutanten zu charakterisieren, wurde der Infektionsverlauf der einzelnen Mutanten mikroskopisch näher untersucht. Dazu wurden verschiedene Färbungen durchgeführt, die mittels konfokaler Mikroskopie in Zusammenarbeit mit Gunther Döhlemann (MPI Marburg) visualisiert wurden. In allen Fällen wurde das dritte Blatt etwa zwei Zentimeter unterhalb der Infektionseinstiche analysiert.

Mit Hilfe der WGA-AF488/Propidium-Iodid (WGA-AF488/PI) Färbung kann die Proliferation der Pilzhyphen innerhalb des Blattgewebes visualisiert werden (Döhlemann et al, 2009). WGA-AF488 („wheat germ agglutinin“) ist ein an den grün fluoreszierenden Farbstoff Alexafluor488 gekoppeltes Lektin, das an die Chitinzellwand der Pilzhyphen bindet. Propidium-Iodid hingegen färbt die Plasmamembran intakter Pflanzenzellen rot. Ist die Zellintegrität gestört, kommt es durch Interkalieren mit Nukleinsäure auch zur Färbung des Nukleus und anderer intrazellulärer Strukturen. In vitalen Zellen wird dies verhindert, da der Farbstoff nicht membrangängig ist. WGA-AF488/PI gefärbte Präparate wurden mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert und die Signale durch Überlagerung von Bildern drei-dimensional dargestellt.

Anhand der Übersichtsbilder erkennt man deutlich, dass sich der Infektionsverlauf der *mcs1*-Deletionsmutante nach Penetration der Epidermis gravierend von dem des Vorläuferstammes SG200 und dem Kontroll-Komplementationsstamm SG200G₃Mcs1 unterscheidet (Abb. 13). So wurde drei Tage nach Infektion mit SG200Δ*mcs1* keine Proliferation der Pilzhyphen im Blattgewebe festgestellt (Abb. 13). SG200 und SG200G₃Mcs1 Hyphen haben sich, wie in Abb. 13 dargestellt, schon nach drei Tagen im gesamten Pflanzengewebe ausgebreitet und weisen eine starke Quervernetzung entlang der Leitbündel auf. SG200Δ*mcs1* Penetrationshyphen stattdessen arretieren, wie in Weber et al. (2006) beschrieben, meist direkt nach dem Durchdringen der Pflanzenoberfläche in den ersten Epidermiszellen. Dadurch kommt es lediglich zu einer lokalen Besiedlung, die sich auf nur wenige Zellen beschränkt, jedoch zu keiner Quervernetzung entlang der Leitbündel. Drei Tage nach Infektion konnten kaum Hyphen, die in tiefere Schichten der pflanzlichen Epidermis vorgedrungen waren, visualisiert werden. Ein Vordringen der SG200Δ*mcs1* Hyphen in das Mesophyll wurde zu

keinem Zeitpunkt nachgewiesen. In vielen Fällen ging die Penetration der *mcsI*-Deletionsmutante mit einer starken PI-Färbung der penetrierten Zelle einher (nicht gezeigt). Dies deutet auf eine gestörte Zellintegrität hin, die durch die Penetration von SG200 Δ *mcsI* verursacht wurde.

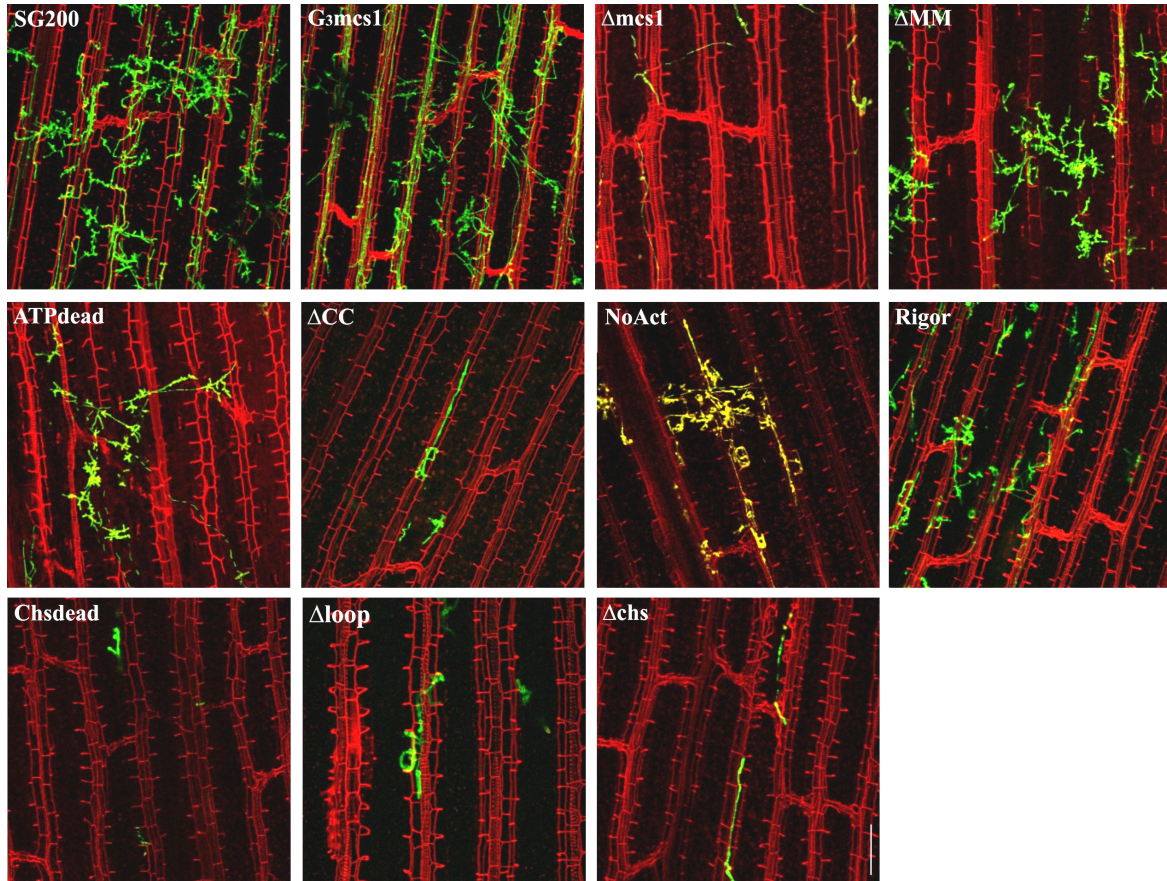


Abb. 13. Übersichtsaufnahmen von WGA-AF488/PI-Färbungen von infiziertem Maisgewebe. Pilzstrukturen auf der Pflanzenoberfläche sowie innerhalb des Pflanzengewebes wurden mittels WGA-AF488 angefärbt (grün). Pflanzenzellwände sowie tote Pflanzenzellen wurden mit Propidium-Iodid (PI) visualisiert (rot). Die Färbung ist in der Nähe von Leitbündeln besonders ausgeprägt. Im Gegensatz zu SG200 Δ *mcsI* (Δ *mcsI*), G_3 *McsI* ^{Δ CC}, G_3 *McsI*^{Chsdead}, G_3 *McsI* ^{Δ loop} und G_3 *McsI* ^{Δ chs}, erkennt man nach SG200 und SG200 G_3 *McsI* Infektion intrazellulär stark proliferierende Hyphen. G_3 *McsI* ^{Δ MM}, G_3 *McsI*^{ATPdead}, G_3 *McsI*^{Rigor} und G_3 *McsI*^{NoAct} zeigen einen intermediären Phänotyp. Bei allen Bildern handelt es sich um konfokale „Z-stacks“, die drei Tage nach der Infektion aufgenommen wurden. Der Größenmaßstab beträgt 100 μ m.

Ähnlich wie die *mcsI*-Deletionsmutante verhielten sich auch SG200 G_3 *McsI*^{Chsdead}, SG200 G_3 *McsI* ^{Δ CC}, SG200 G_3 *McsI* ^{Δ loop} und SG200 G_3 *McsI*H (= Δ *chs*). Auch hier wurde nur ein lokales, auf wenige Zellen beschränktes, *in planta* Wachstum beobachtet (Abb. 13). Die Mutanten zeigten ebenfalls keine Ausbreitung entlang der Leitbündel und ein eingeschränktes laterales Wachstum. Die Stämme SG200 G_3 *McsI* ^{Δ MM}, SG200 G_3 *McsI*^{ATPdead}, SG200 G_3 *McsI*^{NoAct} und SG200 G_3 *McsI*^{Rigor} wiesen hingegen einen intermediären Phänotyp auf, was mit der teilweisen Komplementation des apathogenen *mcsI*-Deletionsphänotyps einhergeht. Man erkennt jedoch auch hier eine stark verringerte Proliferation im Vergleich zu

den Kontrollstämmen SG200 und SG200G₃Mcs1 (Abb. 13 und Abb. 14). Die MMD-Mutationsstämme SG200G₃Mcs1^{ΔMM}, SG200G₃Mcs1^{ATPdead}, SG200G₃Mcs1^{NoAct} und SG200G₃Mcs1^{Rigor} weisen ein lokal begrenztes, nestartiges Wachstum auf, das auf wenige Zellen beschränkt war. Zwischen diesen isolierten Bereichen bestanden kaum Verbindungen durch laterales Hyphenwachstum.

Zur quantitativen Bestimmung der Pilzmenge im infizierten Gewebe mittels qPCR, wurde DNA aus mit *U. maydis* infiziertem Blattgewebe isoliert (8 dpi). Dabei wurden saprophytisch *on planta* wachsende Pilzhypen von der Blattoberfläche infizierter Pflanzen entfernt. Als Referenzgen für die Quantifizierung des Pilzmaterials wurde das *ppi* Gen (Peptidylprolyl-Isomerase) verwendet, das ein konstitutiv exprimiertes Transkript aufweist (Bohlmann, 1996); als Referenzgen für Mais diente *gapdh*. Nur wenig Pilzmaterial wurde in mit SG200Δmcs1, G₃Mcs1^{Chsdead}, G₃Mcs1^{ACC} und G₃Mcs1H (Δchs) infizierten Blattbereichen detektiert. Die qPCR Ergebnisse für G₃Mcs1^{Δloop} zeigen im Gegensatz zu der in den Übersichtsbildern sichtbaren, verminderten Besiedelung eine erhöhte Pilzmenge im Blatt (Abb. 14).

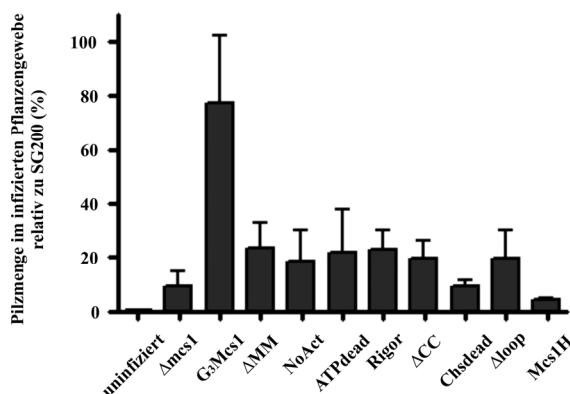


Abb. 14. Quantitative Analyse zur Bestimmung der Pilzmenge im Maisgewebe. Die relative Pilzbiomasse wurde durch Verwendung *U. maydis*- und Pflanzen-spezifischer Oligonukleotide ermittelt. Die Balken geben Verhältnisse von pilzlicher zu pflanzlicher DNA an. Der Wert von mit SG200 infiziertem Blattmaterial wurde auf 100% gesetzt. Es wird der Mittelwert aus zwei bis acht unabhängigen Experimenten dargestellt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Um die Unterschiede des biotrophen Wachstums zwischen den einzelnen Mutanten ausführlicher beschreiben zu können, wurde die Hyphenmorphologie durch Nahaufnahmen charakterisiert. Die Detailaufnahmen zeigen, dass SG200- und SG200G₃Mcs1-Hypen ein gerichtetes Längenwachstum mit Septierungen und regelmäßigen Verzweigungen aufweisen (Abb. 15). SG200Δmcs1 Penetrationshyphen stattdessen arretierten, wie in Weber et al. (2006) beschrieben, meist direkt nach dem Durchdringen der Pflanzenoberfläche in den ersten Epidermiszellen und bildeten dort ballonartige und geschwollene Strukturen aus. Ähnlich wie die Deletionsmutante verhielten sich auch SG200G₃Mcs1^{Chsdead}, SG200G₃Mcs1^{ACC}, SG200G₃Mcs1^{Δloop} und SG200G₃Mcs1H (=Δchs). Intrazelluläre Hyphen waren meist aufgebläht und wiesen sphärische Strukturen auf. Dieses ungleichförmige und unregelmäßige Hyphenwachstum konnte auch zum Teil bei den Motordomänen-Mutanten

SG200G₃Mcs1^{ΔMM}, SG200G₃Mcs1^{ATPdead}, SG200G₃Mcs1^{NoAct} und SG200G₃Mcs1^{Rigor} beobachtet werden (Abb. 15). Man erkennt eine durch gestörte Septierung und Verzweigung hervorgerufene Aggregation von Hyphen, die bei SG200G₃Mcs1^{ΔMM}, SG200G₃Mcs1^{ATPdead} und SG200G₃Mcs1^{NoAct} besonders ausgeprägt war. Auch nach Infektionen mit diesen Stämmen konnten vermehrt sphärische Strukturen visualisiert werden.

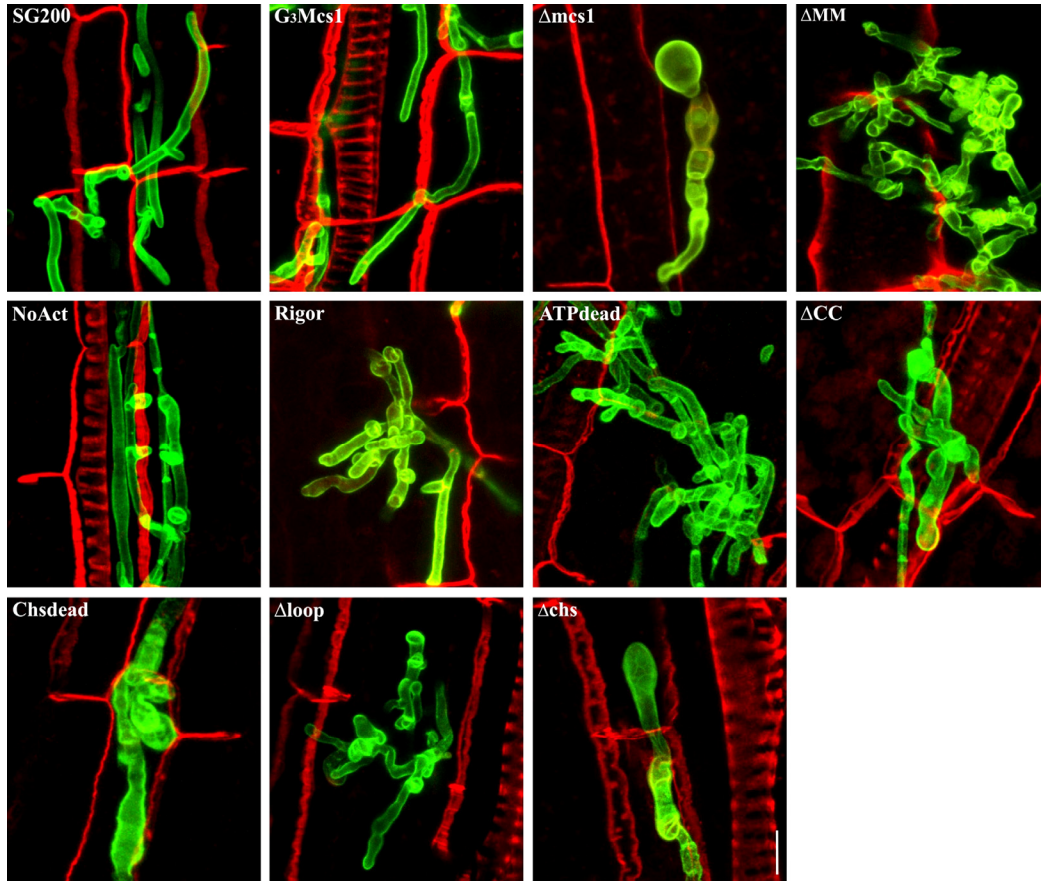


Abb. 15. Detailaufnahmen von WGA-AF488/PI-Färbung von infiziertem Maisgewebe. Pilzstrukturen innerhalb des Pflanzengewebes wurden mittels WGA-AF488 angefärbt (grün). Pflanzenzellwände wurden mit Propidium-Iodid (PI) visualisiert (rot). Die Färbung ist in der Nähe von Leitbündeln besonders ausgeprägt. Nach Infektion erkennt man bei den Stämmen SG200Δmcs1 (*Δmcs1*), G₃Mcs1^{ΔCC}, G₃Mcs1^{Chsdead}, G₃Mcs1^{Δloop} und G₃Mcs1^{Δchs} ein stark verändertes Hyphenwachstum. Im Gegensatz zur SG200 und SG200G₃Mcs1 Hyphen, die innerhalb der Pflanze gerichtet wachsen, zeigen intrazelluläre Pilzstrukturen eine stark verdickte, ballonartige Morphologie. G₃Mcs1^{ΔMM}, G₃Mcs1^{ATPdead}, G₃Mcs1^{Rigor} und G₃Mcs1^{NoAct} zeigen einen intermediären Phänotyp. Bei allen Bildern handelt es sich um konfokale „Z-stacks“, die drei Tage nach der Infektion aufgenommen wurden. Der Größenmaßstab beträgt 10 μm.

Um den intermediären Phänotyp der Motordomänen-Mutanten näher zu charakterisieren, wurden intrazelluläre Hyphen bezüglich ihrer Morphologie analysiert und anhand ausgewählter Merkmale quantifiziert (Abb. 16).

Eines der auffälligsten Merkmale in den beschriebenen Mutanten war die Anhäufung ballonartiger Hyphenstrukturen. Aufgrund dessen wurde der Hyphendurchmesser innerhalb der apikalen 10 μm gemessen (Abb. 16, links). Dieser beträgt in SG200 und SG200G₃Mcs1 Kontrollhyphen ca. 2,5 μm. Man erkennt eine deutliche Zunahme des Durchmessers von

Hyphen der *mcs1*-Mutanten im Vergleich zu SG200 und SG200G₃Mcs1. Auffällig ist, dass sich SG200Δ*mcs1* und G₃Mcs1^{Chsdead} ähnlich verhalten. Es konnte, im Vergleich zur Kontrolle, ein doppelt so großer mittlerer Hyphendurchmesser von ca. 5 μm ermittelt werden. Ähnlich verhielt sich die G₃Mcs1^{ACC}-Mutante, für dessen intrazelluläre Hyphen ein mittlerer Durchmesser von 4-4,5 μm gemessen wurde. Bezüglich des Hyphendurchmessers konnte für die Motordomänenstämme G₃Mcs1^{ΔMM}, G₃Mcs1^{ATPdead}, G₃Mcs1^{Rigor} und G₃Mcs1^{NoAct} mit 3,5 μm der intermediäre Phänotyp bestätigt werden.

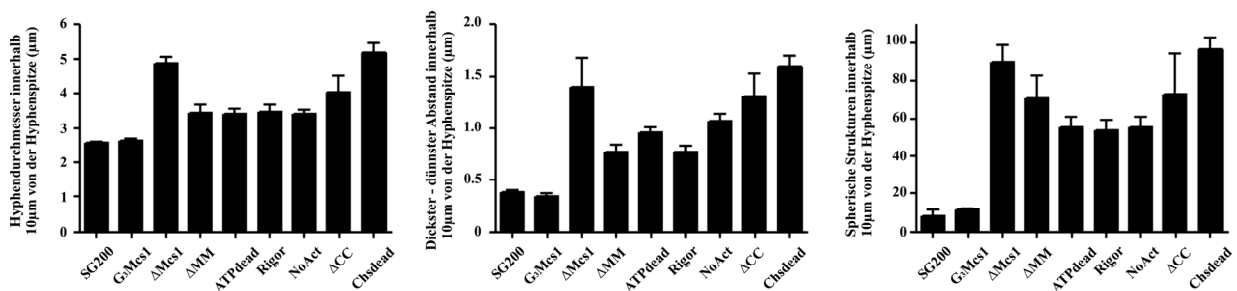


Abb. 16. Morphologische Charakterisierung intrazellulärer Hyphen ausgewählter *mcs1*-Mutanten. WGA-AF488-gefärbte Pilzstrukturen wurden innerhalb des Pflanzengewebes auf morphologische Merkmale hin analysiert. Der mittlere Hyphendurchmesser wurde innerhalb der apikalen Hyphenspitze gemessen (links). Um die Varianz im Hyphendurchmesser zu bestimmen, wurde über eine Länge von 10 μm, mindestens 5 μm entfernt vom nächsten Septum, die dickste und die dünnste Stelle bemessen und die Differenz berechnet (Mitte). Des Weiteren wurde die Anhäufung sphärischer Strukturen analysiert. Diese wurden als sphärisch definiert, wenn deren Hyphendurchmesser mindestens 1,25x dem mittleren Hyphendurchmesser der Kontrolle, d. h. mehr als 3,2 μm entsprach.

Anhand der Detailaufnahmen wurde deutlich, dass der Hyphendurchmesser der Mutationsstämme stark variiert und diese ein kurvig-wachsendes Wachstum aufweisen. Um diese Eigenschaft quantitativ darstellen zu können, wurde über eine Länge von 10 μm, mindestens 5 μm entfernt vom nächsten Septum, die dickste und die dünnste Stelle gemessen. Die Differenz dieser Werte dient als Indikator für die Wachstumsvarianzen innerhalb der Hyphen (Abb. 16, Mitte). Schwankungen im Hyphendurchmesser konnten für SG200 und SG200G₃Mcs1 kaum gemessen werden und lagen lediglich bei ca. 0,3 μm. Alle anderen untersuchten Stämme (Δ*mcs1*, G₃Mcs1^{ΔMM}, G₃Mcs1^{ATPdead}, G₃Mcs1^{Rigor}, G₃Mcs1^{NoAct}, G₃Mcs1^{ACC} und G₃Mcs1^{Chsdead}) zeigten starke Varianzen in der intrazellulären Hyphenmorphologie, wobei für Δ*mcs1*, G₃Mcs1^{ACC} und G₃Mcs1^{Chsdead} bis zu 1,7 μm Differenz zwischen dickster und dünnster Stelle gemessen werden konnte. Dies war vermutlich auf die Häufigkeit sphärisch wachsender Hyphen zurückzuführen. Eine ballonartige Struktur wurde als sphärisch definiert, wenn deren Hyphendurchmesser mindestens dem 1,25-fachen Wert des mittleren Hyphendurchmessers der Kontrolle entsprach (≥ 3,2 μm). Für SG200 und SG200G₃Mcs1 Infektionen konnte ein Anteil von weniger als

10% der gemessenen Hyphen als sphärisch eingruppiert werden. Dieser Anteil erreichte dagegen bei den analysierten Mutanten bis zu 100% (Abb. 16, rechts).

2.4 Charakterisierung der Pflanzenreaktion nach Infektionen mit *mcs1*-Mutationsstämmen

Die bisherigen Untersuchungen wiesen darauf hin, dass sowohl SG200 Δ *mcs1* als auch die *mcs1*-Punktmutations- und Deletionsstämme verstärkte pflanzliche Abwehrreaktionen induzieren. Diese werden normalerweise erfolgreich vom Pilz supprimiert (Doehlemann et al, 2008b). Um diese potentielle Immunantwort näher zu untersuchen, wurde infiziertes Maisgewebe mikroskopisch durch Einsatz verschiedener Färbetechniken genauer analysiert. Zusätzlich wurde versucht, die Reaktion von Maispflanzen auf eine Infektion mit den entsprechenden *Mcs1*-Mutanten mittels quantitativer RT-PCR zu analysieren.

2.4.1 *mcs1*-Mutationsstämme induzieren eine Akkumulation von H₂O₂

Nach Infektionen mit den Mutationsstämmen kommt es makroskopisch zur Ausbildung von Nekrosen, was auf eine Erkennung und Abwehr des Pilzes durch die Maispflanze hinweist. Die induzierten Resistenzreaktionen gehen meist mit einer verstärkten Produktion und Akkumulation von Peroxidasen, Phenolen und H₂O₂ einher (Hückelhoven et al, 1999; von Ropenack et al, 1998). Um letzteres zu testen, wurden infizierte Blätter mit Diaminobenzidin (DAB) angefärbt ((Fryer et al, 2002; Molina & Kahmann, 2007; Thordal-Christensen, 1997); Abb. 17). DAB bildet in Anwesenheit von H₂O₂ ein braunes Präzipitat, das mit Hilfe einer Farbkamera visualisiert werden kann. In SG200 und SG200G₃*Mcs1* Infektionen konnte nur sehr selten ein eindeutiges braunes DAB-Präzipitat in Assoziation mit Pilzhypen detektiert werden (Abb. 17). In mit SG200 Δ *mcs1* infizierten Pflanzen wurde hingegen 36 Stunden nach der Infektion eine eindeutige Bildung von H₂O₂ beobachtet. Das braune DAB-Präzipitat akkumulierte spezifisch um die pilzliche Hyphe (Abb. 17). Auch in mit den Motordomänen-Mutationsstämmen infizierten Pflanzen konnte eine eindeutige, aber abgeschwächte Bildung von H₂O₂ bestätigt werden. Das braune DAB-Präzipitat akkumulierte auch hier spezifisch um die pilzliche Hyphen und in Bereichen, in denen vermutlich polares Wachstum stattfindet. Eine ähnlich starke Färbung wie bei SG200 Δ *mcs1* (Δ *mcs1*) erkennt man dagegen an Hyphenspitzen nach Infektion mit SG200G₃*Mcs1*^{Chsdead} (*chsdead*). Die sphärischen Hyphenstrukturen werden vollständig vom braunen Präzipitat umschlossen.

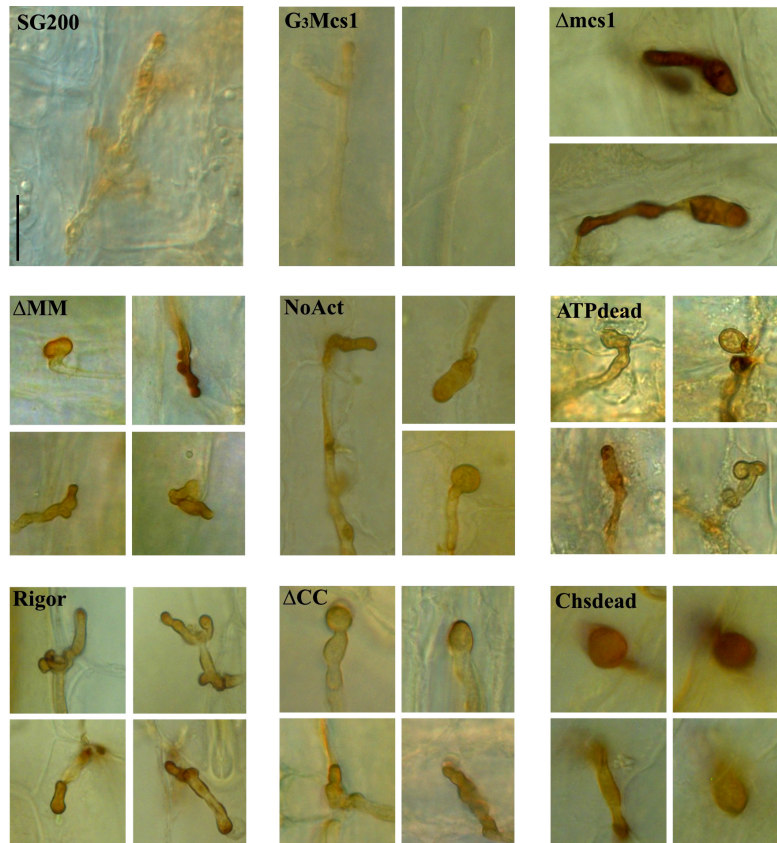


Abb. 17. Diaminobenzidin-Färbungen von infiziertem Maisgewebe. Die Abbildungen zeigen *U. maydis* Hyphen im Pflanzengewebe nach Diaminobenzidin- (DAB) Färbung (36 Stunden nach der Infektion). Dargestellt sind Infektionen mit SG200, SG200G₃Mcs1, SG200Δmcs1 und ausgewählten Mutationsstämmen. Das in Gegenwart von H₂O₂ gebildete Präzipitat wurde mit einer Farbkamera aufgenommen und erscheint dunkelbraun. Der Größenstandard entspricht 15 µm.

2.4.2 *mcs1*-Mutanten induzieren einen Apoptose-ähnlichem Zelltod

Eine globale Resistenzreaktion von Pflanzen, die durch eine inkompatible Interaktion mit einem Pathogen hervorgerufen wird, ist das schnelle Absterben infizierter Bereiche. Dieses wird durch eine hypersensitive Reaktion ausgelöst (Baker et al, 1997; Stakman, 1915). Mittels Färbung infizierter Maisblätter mit FM4-64 wurde in Zusammenarbeit mit G. Döhlemann (MPI Marburg) überprüft, ob durch Infektion mit ausgewählten *mcs1*-Mutanten ein hypersensitiver Zelltod in den Pflanzenzellen induziert wird. Mit Hilfe des Farbstoffs FM4-64 können Pilz- und Pflanzenmembranen durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie visualisiert werden (Doehlemann et al, 2008a; Kankanala et al, 2007). Für die parallele Detektion von Pilzhypen auf der Pflanzenoberfläche wurden diese mit WGA-AF488 angefärbt. Nach SG200G₃Mcs1 Kontrollinfektion konnte mit Hilfe von FM4-64 das intrazelluläre Wachstum der Pilzhypen beobachtet werden. Wie erwartet, lokalisiert die pflanzliche Plasmamembran an der Zellperipherie und ummantelte die Pilzhypen (Abb. 18; weiße Pfeile). In von SG200Δmcs1, SG200G₃Mcs1^{ΔMM} und SG200G₃Mcs1^{Chsdead} penetrierten Maiszellen hingegen, erschien nach 36 Stunden die pflanzliche

Cytoplasmamembran desintegriert und es wurde eine starke intrazelluläre Vesikelbildung beobachtet (Abb. 18; $\Delta mcs1$, ΔMM , $Chsdead$).

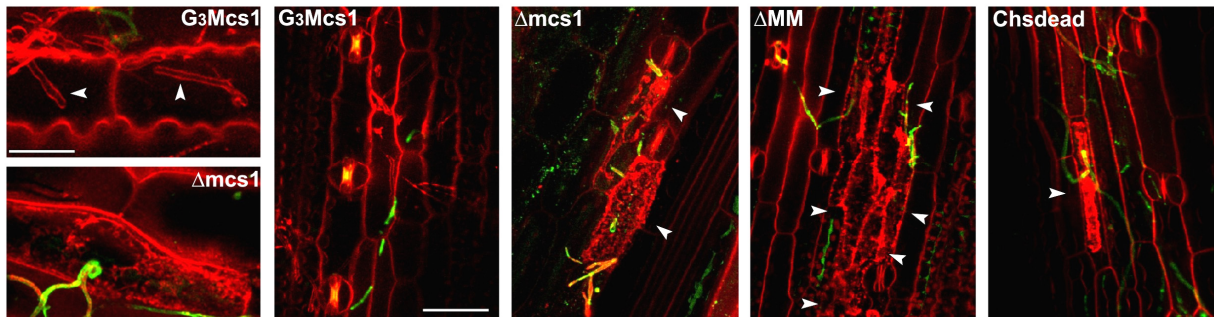


Abb. 18. WGA-AF488/FM4-64 Färbung zur Detektion von sterbendem Gewebe in infizierten Maispflanzen. Querschnitt durch die Epidermis nach Infektion mit SG200G₃Mcs1, SG200 Δ mcs1, SG200G₃Mcs1 Δ MM und SG200G₃Mcs1^{Chsdead} (36 hpi). Pflanzliche Plasmamembran und Membranen von kollabiertem Pflanzengewebe wurden mittels FM4-64 angefärbt (rot). Pilzhypen sind durch WGA-AF488 gefärbt und in grün dargestellt. Links Detailaufnahme von mit SG200G₃Mcs1, SG200 Δ mcs1 infizierten Blattmaterial. Größenbalken entspricht 25 μ m. Rechts: Aufsicht auf die Pflanzenoberfläche nach Infektion mit SG200G₃Mcs1, SG200 Δ mcs1, SG200G₃Mcs1 Δ MM und SG200G₃Mcs1^{Chsdead} (36 hpi). Der Größenstandard entspricht 50 μ m. Die weißen Pfeile weisen auf kollabierte Zellen hin.

Diese Merkmale kommen typischerweise in sterbenden Zellen vor und waren daher ein weiteres Indiz für eine hypersensitive Antwort auf die Infektion mit den *mcs1*-Mutanten. Auch in SG200G₃Mcs1 Infektionen konnten gelegentlich sterbende Zellen mit multiplen Vesikeln beobachtet werden (nicht gezeigt), jedoch war die Frequenz hier um ein Vielfaches geringer (vgl. auch (Doehleemann et al, 2008b)). In Übereinstimmung mit vorherigen Beobachtungen, bei denen sich die Proliferation von SG200 Δ mcs1 und SG200G₃Mcs1^{Chsdead} Hyphen nur auf wenige Maiszellen beschränkten, ist auch hier das gezielte Absterben von penetrierten Einzelzellen zu erkennen. Bei SG200G₃Mcs1 Δ MM hingegen sind größere kollabierende Zellaggregate zu verzeichnen.

2.4.3 Transkriptionsanalysen infizierter Maispflanzen

Um ein genaueres Bild von der induzierten Abwehrreaktion zu erhalten, wurden Analysen infizierter Maispflanzen mittels qPCR durchgeführt. Bereits publizierte umfangreiche Transkriptomanalysen von Maispflanzen nach SG200 Infektion, aber auch nach Infektion mit einem SG200 Δ pep1-Deletionsstamm (inkompatible Mutante) wurde bei der Auswahl der untersuchten Maisgene und zum Abgleich der Ergebnisse herangezogen (Doehleemann et al, 2009; Doehleemann et al, 2008b). Als zu untersuchende Maisgene wurden hauptsächlich PR-Gene („pathogen-related genes“) ausgewählt, die nach *U. maydis*-Infektion mit SG200 nach 24h ein verändertes Expressionsmuster im Vergleich zur Kontroll-Infektion (mock) bzw. SG200 Δ pep1-Infektionen zeigten (Tabelle 3). Die Expression der ausgewählten Marker-Maisgene wurde nach Infektion mit SG200, SG200G₃Mcs1, SG200G₃Mcs1 Δ MM und

SG200 Δ mcs1 analysiert. Für den Zeitpunkt der Probennahme wurden 24 und 36 nach Infektion gewählt, da für diesen Zeitraum eine verstärkte Pflanzenabwehr nach SG200 Δ mcs1-Infektionen beobachtet werden konnte (vgl. 2.4.1, 2.4.2).

Tabelle 3: Auswahl der untersuchten Maisgene und deren publizierte Expressionsänderung (24hpi).

Microarray probe set	Funktion/Annotation ¹	Accession ²	Expressionsänderung SG200 vs. mock ³
Zm.1085.1.A1_a_at	PR3, Chitinase A	BM339391	23.48
Zm.2227.1.A1_at	PR4 Chitinase D	BM381059	108.75
Zm.6659.1.A1_at	PR5 Osmotin-ähnliches Protein	BM075306	32.28
			Expressionsänderung SG200 vs. SG200 Δ pep1 ⁴
Zm.9636.1.A1_at	Wir1A Protein	BM349325	11.49
Zm.2136.1.S1_at	Peroxidase 12	AW282383	5.14
Zm.3303.1A1_at	Lipoxygenase 1 (LOX1)	AF271894.1	-5.71
Zm.9034.1.A1_at	Bowman-Birk Trypsin Inhibitor	BM382061	-248.77

¹ Die Annotation wurde aufgrund von BLAST Ergebnissen ermittelt

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

³ (Doehlemann et al, 2008a)

⁴ (Doehlemann et al, 2009)

Aufgrund der in 2.4.1 und 2.4.2 beobachteten unterschiedlich starken Pflanzenabwehrreaktionen nach Infektionen mit SG200, SG200G₃Mcs1, SG200G₃Mcs1 ^{Δ MM} und SG200 Δ mcs1, wurde angenommen, dass diese Unterschiede auch in den Transkriptionsanalysen der untersuchten Maisabwehrgene sichtbar werden. Wie erwartet, zeigte die transkriptionelle Immunantwort nach SG200 Infektionen im Vergleich zu Infektionen mit dem Kontrollstamm SG200G₃Mcs1 keine signifikanten Unterschiede (nicht gezeigt). Überraschenderweise konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikante Differenzen im Expressionsmuster der Maisgene nach Infektionen mit den Stämmen SG200G₃Mcs1 ^{Δ MM} und SG200 Δ mcs1 im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden (nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass, wie in Abb. 13 sichtbar und mittels qPCR quantitativ dargestellt, die Pilzmenge im infizierten Blattgewebe nach Infektion mit SG200G₃Mcs1 ^{Δ MM} und SG200 Δ mcs1 im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert ist.

Anhand der in diesen Abschnitten ermittelten Ergebnisse lässt sich schließen, dass sowohl die Myosinmotor- als auch die Chitinsynthase-Domäne von Mcs1 für die Funktion während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* eine entscheidende Rolle spielen. Die Rolle der jeweiligen Domänen des Fusionsproteins scheint jedoch unterschiedlich zu sein, da Infektionen mit Myosinmotor-Mutationsstämmen, im Gegensatz zum Chitinsynthase-

Mutationsstamm, den apathogenen Phänotyp der Deletionsmutante teilweise komplementieren können. Dies unterstützt die Hypothese, dass der Myosin-Motordomäne in der Anlieferung des Proteins und der Chitinsynthase-Domäne für die Zellwandsynthese eine bedeutende Rolle zukommt.

2.5 G₃Mcs1-Lokalisationsstudien

Wie bereits bekannt, lokalisiert Mcs1YFP in haploiden Sporidien und Filamenten an neu gebildeten Septen und bildet einen Gradienten zur Hyphenspitze aus (Weber et al, 2006). Mittels der sensitiven Laser-basierenden Epifluoreszenz-Mikroskopie wurden an der „School of Biosciences“ an der Universität Exeter, die bereits bekannten Ergebnisse verifiziert. Die Mcs1-Lokalisierung wurde zunächst in einem Stamm visualisiert, der G₃Mcs1 und ein an mCherry fusioniertes, Plasmamembran-gebundendes Syntaxin Sso1 (Um04228), produziert (SG200G₃Mcs1mChSso1). In Filamenten lokalisierte G₃Mcs1 an der Plasmamembran der apikalen Wachstumsregion und bildet dort, wie beschrieben, einen Gradienten aus (Abb. 19A). Zusätzlich erkennt man deutlich einzelne, sich nicht bewegende G₃Mcs1-Signale in der Zellperipherie in der Nähe der Wachstumszone (Abb. 19A).

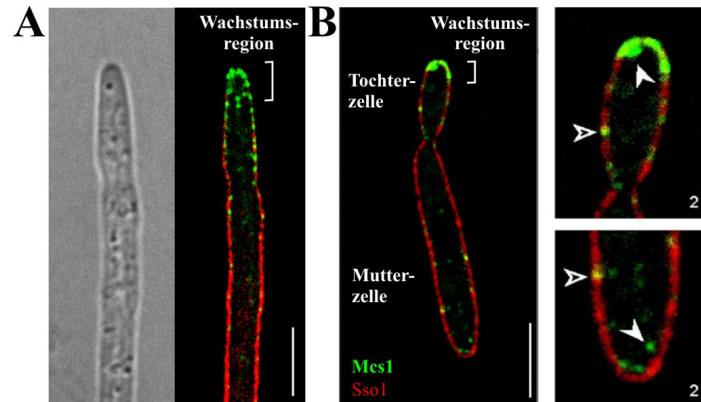


Abb. 19. Lokalisierung von G₃Mcs1 an der apikalen Wachstumsregion in Hyphen und haploiden Sporidien. G₃Mcs1 Lokalisierung in einem Stamm, in dem G₃Mcs1 (grün) und der an mCherry fusionierten Plasmamembranmarker Sso1 (rot) exprimiert wird (SG200G₃Mcs1_mChSso1). (A) G₃Mcs1-Lokalisierung in Hyphen. (B) G₃Mcs1-Lokalisation in Sporidien. G₃Mcs1 lokalisiert an der Plasmamembran der Wachstumsregion der Tochterzelle. Einige Signale konnten in der Plasmamembran abseits der Spitze (offene Pfeile) und in der Zellperipherie (weiße Pfeile) beobachtet werden. Die Größenbalken entsprechen 5 bzw. 2 μ m. (Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit G. Steinberg erstellt.)

In Knospen mittlerer Größe sich teilender Sporidien lokalisierte G₃Mcs1 ebenfalls in der apikalen Wachstumsregion und bildet dort eine Kappen-ähnliche Struktur aus. Zudem wurden punktförmige, sich nicht bewegende G₃Mcs1-Signale in der Plasmamembran entfernt von der Wachstumszone beobachtet (offene Pfeile). Des Weiteren wurden auch G₃Mcs1-Signale in

der Zellperipherie visualisiert, die keine Plasmamembran-Lokalisierung zeigten (weiße, geschlossene Pfeile).

2.6 Die Rolle des Cytoskeletts für die Anlieferung von Mcs1

Die ungewöhnliche Protein-Domänenstruktur der Myosin-Chitinsynthase Mcs1 könnte darauf hinweisen, dass diese Klasse V Chitinsynthase (CHS) (=Klasse XVII Myosin) die eigene MMD für die polare Anlieferung der Chitinsynthase-Domäne zur Wachstumszone nutzt. Alternativ könnten jedoch auch andere Aktin-abhängige Motoren (andere Myosine) oder Mikrotubuli-abhängige Motorproteine (z. B. Kinesine) die mit Mcs1-beladenen Chitosomen anliefern (vgl. Abb. 5).

Um zunächst die Rolle des Cytoskeletts für die Mcs1-Anlieferung zur apikalen Region zu untersuchen, wurden Inhibitor-Experimente durchgeführt. Dabei wurden Hemmstoffe in bekannten, für *U. maydis* wirksamen, Konzentrationen verwendet, die das Aktin- und Mikrotubuli-Cytoskelett beeinflussen sowie Myosine spezifisch inhibieren, können (Fuchs et al, 2005; Weber et al, 2003). Für die Untersuchungen wurde ein Stamm verwendet, der bereits von U. Fuchs hergestellt und zur Verfügung gestellt wurde. Es handelte sich dabei um ein AB33-Derivat, bei dem die Bildung b-abhängiger Filamente in axenischer Kultur durch einen Wechsel von Ammonium- zu Nitratminimalmedium stimuliert werden kann (Brachmann et al, 2001) und bei dem im endogenen Locus ein dreifaches *egfp* (G_3) an das 3'-Ende von *mcs1* fusioniert ist (AB33Mcs1 G_3). Um die *mcs1G₃*-Expression regulieren zu können, wurde in diesem Stamm der endogene *mcs1*-Promotor durch den Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotor (r=regulierbar) ausgetauscht (AB33rMcs1 G_3). In einem Zeitreihe-Experiment wurde zunächst die induzierbare Expression mikroskopisch getestet und mittels Immunblot (Abb. 20A) verifiziert. Das ca. 305 kDa große Mcs1 G_3 -Fusionsprotein konnte im Ausgangsstamm (AB33Mcs1 G_3) wie erwartet mit Hilfe eines GFP-Antikörpers detektiert werden (Mcs1 G_3 , 0h). Im Stamm AB33rMcs1 G_3 , in dem die *mcs1G₃*-Expression durch den induzierbaren Promotor reguliert werden kann, konnten bereits drei Stunden nach Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glukose zu Arabinose die entsprechenden Fusionsproteine nachgewiesen werden (rMcs1 G_3 , 3h, Abb. 20A). Eine erhöhte Proteinmenge, verursacht durch Induktionszeiten von mehr als fünf Stunden, ging meist mit einem vermehrten Proteinabbau einher.

Auch mikroskopisch ließ sich gut erkennen, dass in Anwesenheit von Glukose die Geninduktion reprimiert wird und demnach kein GFP-Signal visualisiert werden konnte (Abb.

20B, AUS). Drei bis fünf Stunden nach Zugabe der Kohlenstoffquelle Arabinose konnte die polare Mcs1-Lokalisierung hingegen mikroskopisch detektiert werden (Abb. 20B, AN).

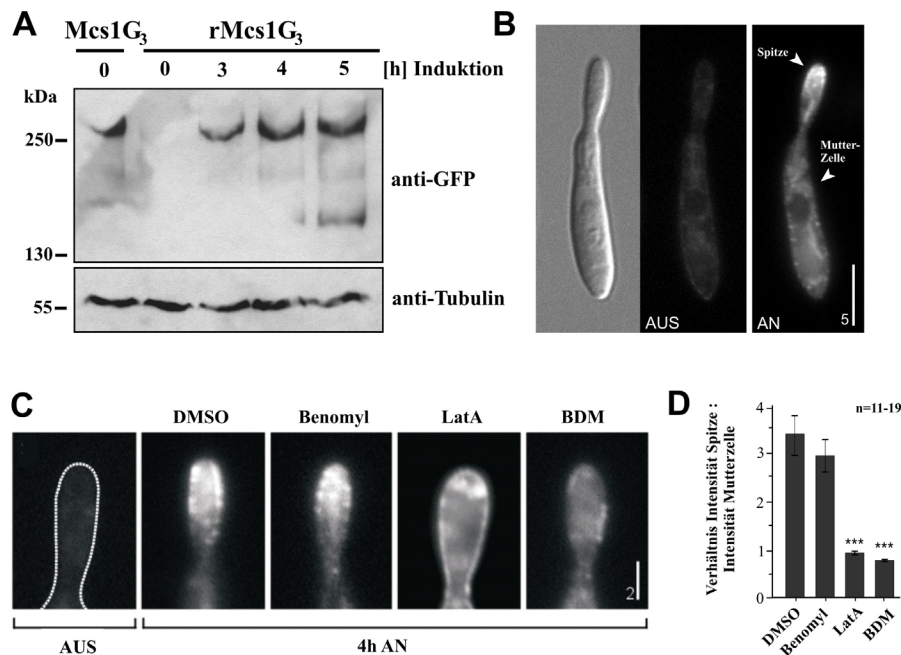


Abb. 20. Rolle des Cytoskeletts für die Anlieferung von Mcs1G₃ (A) Expressionsanalyse des Reporterkonstrukts zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Induktion. (B) Lokalisation von Mcs1G₃ vor (AUS) und nach vierstündiger Induktion (AN). Größenstandard = 5 µm. (C) Lokalisation von Mcs1G₃ in Anwesenheit der Cytoskelett-Inhibitoren nach vierstündiger Induktion. Größenbalken entspricht 2 µm. (D) Balkendiagramm, dass das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der Spitze zur Mutterzelle in Anwesenheit des Lösungsmittels DMSO, des Mikrotubuli-Inhibitors Benomyl (30 µM), des Aktin-Inhibitors Latrunculin A (LatA, 10 µM) und des Myosin-Inhibitors BDM (BDM, 10 mM) im Stamm SG200rMcs1G₃ darstellt.

Um den Einfluss des Aktin- und Mikrotubuli-Cytoskeletts für die Mcs1-Anlieferung zu untersuchen, wurde die polare Mcs1-Lokalisation nach Zugabe von Cytoskelett-Inhibitoren analysiert. Dabei wurden die Zellen zwei Stunden nach Induktion des *crg*-Promotors mit verschiedenen Hemmstoffen inkubiert und nach vier Stunden die Mcs1G₃-Lokalisierung visualisiert. Es war zu erkennen, dass das Inhibitor-Lösungsmittel DMSO keinen Einfluss auf die polare Mcs1-Lokalisation hat und das Fusionsprotein an der apikalen Region akkumuliert (Abb. 20C, D). Ebenso verhält es sich nach Zugabe des Mikrotubuli-Cytoskelett-Inhibitors Benomyl (30 µM). Auch hier ist die apikale Mcs1-Lokalisation deutlich erkennbar. Durch die Verwendung des Aktin-Cytoskelett-Inhibitors Latrunculin A (10 µM) erkennt man hingegen eine eindeutige Akkumulation des Mcs1G₃-Signals an der gesamten Plasmamembran der behandelten Zellen. Der apikale Gradient geht verloren und die mittlere Signalintensität ist in der Spitze und der Mutterzelle identisch (Abb. 20C und D). Eine analoge Lokalisierung konnte auch nach gleichzeitiger Zugabe beider Cytoskelett-Inhibitoren beobachtet werden (nicht gezeigt). Der Verlust der polaren Akkumulation konnte man auch nach Behandlung mit BDM (2,3-Butaneione 2-Monooxime) ermittelt werden. Diese Chemikalie wirkt als Inhibitor

für die Myosin-ATPase Aktivität und verhindert so die nötige Energiezufuhr für die Phosphorylierung (Mckillop et al, 1994). Zudem konnte gezeigt werden, dass Zugabe von BDM die polare Lokalisation von *U. maydis* Myo5 auflöst (nicht gezeigt; (Weber et al, 2003). Inkubation von *U. maydis* mit BDM hemmt die Akkumulation von Mcs1G₃ an der Spitze und verhindert die Ausbildung einer apikalen Kappe (Abb. 20C und D). Diese Ergebnisse weisen auf eine Rolle des Acto-Myosin-Systems in der polaren Lokalisation der Myosin-Chitinsynthase hin.

2.7 Lokalisierung der Mcs1-Mutationsproteine

Um zu klären, ob die eigene Myosin-Motordomäne für die Anlieferung bzw. Lokalisation von Mcs1 verantwortlich ist, wurde der Einfluss der verschiedenen Punktmutationen und partiellen Deletionen der Mcs1-Myosinmotor- und Chitinsynthase-Domäne untersucht. Dazu wurden Lokalisationsstudien und Motilitätsanalysen mit ausgewählten, in Abb. 9 dargestellten, Mcs1-Mutanten durchgeführt. Die entsprechenden Gene waren am 5'-Ende mit einem 3-fachen *egfp* fusioniert und wurden im *ip*-Lokus von SG200Δ*mcs1* integriert.

2.7.1 Lokalisierung der Mcs1-Mutationsproteine in haploiden Sporidien

Mikroskopische Untersuchungen zeigten deutlich, dass nicht nur die Kontrolle G₃Mcs1, sondern auch die Motordomänen-Mutante G₃Mcs1^{Rigor} und die Chitinsynthase-Mutante G₃Mcs1^{Chsdead} an der apikalen Region der Tochterzellen akkumulieren (Abb. 21A). Keine apikale Anhäufung von G₃Mcs1-Signalen wurde bei den G₃Mcs1^{ΔMM}, G₃Mcs1^{noAct}, G₃Mcs1^{ATPdead}, G₃Mcs1^{ACC} und G₃Mcs1H visualisiert werden. Bei der Lokalisierung von G₃Mcs1^{ΔMM}, G₃Mcs1^{noAct}, G₃Mcs1^{ATPdead}, G₃Mcs1^{ACC} konnten lediglich einige wenige punktförmige Fluoreszenz-Signale an der Spitze beobachten werden, wohingegen man nach Expression des Motorkopfes eine ebenemäßige G₃Mcs1H-Verteilung erkennt (Abb. 21A). Die durch die Fluoreszenzmikroskopie visualisierten Lokalisierungen konnten durch Quantifizierung der GFP-Signale an der Spitze bestätigt werden (Abb. 21B). Dabei wurde die Fluoreszenz-Intensität der G₃Mcs1-Fusionsproteine an der apikalen Wachstumsregion gemessen und um den intrazellulären Hintergrund korrigiert.

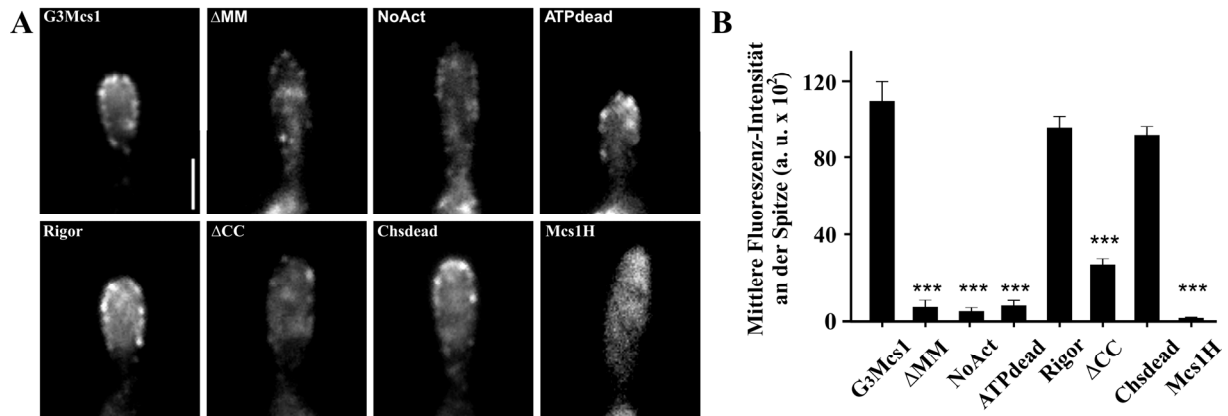


Abb. 21. Lokalisation der Mcs1-Mutationsproteine in der Wachstumsregion von Tochterzellen mittlerer Größe. Alle mutierten Allele wurden in einer *mcs1*-Deletionsmutante exprimiert (Stämme: SG200G₃Mcs1, SG200G₃Mcs1^{ΔMM}, SG200G₃Mcs1^{NoAct}, SG200G₃Mcs1^{ATPdead}, SG200G₃Mcs1^{Rigor}, SG200G₃Mcs1^{ΔCC}, SG200G₃Mcs1^{Chsdead}, SG200G₃Mcs1H). G₃Mcs1, G₃Mcs1^{Rigor} und SG200G₃Mcs1^{Chsdead} weisen an der apikalen Zone eine Kappen-ähnliche Lokalisierung auf. Nur wenige punktförmige Signale lokalisieren in der Wachstumsregion der MMD-Mutanten. Der Größenbalken entspricht 5 μm. (B) Das Balkendiagramm zeigt die gemessene mittlere Fluoreszenz-Intensität der G₃Mcs1-Fusionsproteine an der apikalen Wachstumsregion. Die Signal-Intensität ist um den intrazellulären Hintergrund korrigiert. Es ist der Mittelwert±SEM drei unabhängigen Experimenten mit je 51-69 Zellen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test in Bezug zur Kontrolle ermittelt. Dreifache Sterne geben eine statistische Signifikanz von P<0.0001 an.

2.7.2 Lokalisierung der Mcs1-Mutationsproteine in infiziertem Maisgewebe

Da die Myosin-Chitinsynthase für die erfolgreiche Besiedelung der Pflanze essentiell ist, wurde die Lokalisierung der verschiedenen Mcs1-Mutationsproteine auch in intrazellulär wachsenden Hyphen in infiziertem Maisgewebe analysiert. Die Untersuchungen erfolgten mit Hilfe von konfokaler Laserscanning-Mikroskopie in Zusammenarbeit mit Gunther Doehlemann (MPI Marburg).

Die in den Abb. 22 und Abb. 23 abgebildeten konfokalen „Z-stacks“ zeigen intrazellulär in der Pflanzenepidermis wachsende Hyphen zwei Tage nach Infektion. Zur besseren Darstellung der infektiösen *U. maydis* Hyphen wurde zusätzlich cytoplasmatisches RFP exprimiert. Wie in haploiden Sporidien lokalisiert G₃Mcs1 an der Plasmamembran der apikalen Wachstumsregion und bildet dort, wie in 2.7.1 beschrieben, einen Gradienten aus (Abb. 23).



Abb. 22. G₃Mcs1-Lokalisierung in *mcs1*-Deletionsstämmen in infiziertem Maisblättern. Das Bild wurde 48 Stunden nach der Infektion mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie aufgenommen und zeigt die G₃Mcs1-Lokalisierung in infiziertem Maisgewebe. Die Infektion erfolgte mit einem *mcs1*-Deletionsstamm, der zusätzlich cytoplasmatisches RFP und G₃Mcs1 exprimiert (Stamm: SG200*mcs1*G₃Mcs1RFPcyt). Der Größenbalken entspricht 10 µm.

Infiziertes Maisgewebe wies nach *U. maydis* Infektionen mit den unterschiedlichen Mutationsstämmen im Deletionshintergrund aufgrund der pflanzlichen Abwehrreaktion (vgl. 2.4.1 und 2.4.2) einen starken Fluoreszenzhintergrund auf. Dies führte zu Problemen bei der Trennung des „echten“ GFP-Fluoreszenzsignals vom pflanzlichen Hintergrundsignal. Folglich konnte bei der Detektion der Mutationsproteine im *mcs1*-Deletionshintergrund innerhalb der Pflanze keine Aussage gemacht werden. Daher wurden die mutierten G₃Mcs1-Konstrukte als zusätzliche Kopie in SG200-Derivaten exprimiert, die zur verbesserten Darstellung der intrazellulären Hyphen das an mCherry fusionierte Plasmamembrangebundene Syntaxin Sso1 (Um04228) produzierten (SG200G₃Mcs1mChSso1).

Auch in dem Kontrollstamm (SG200G₃Mcs1) für dieses Experiment akkumulierte das GFP-Signal an der Spitze intrazellulär wachsender Hyphen und bildete einen Gradienten aus (nicht gezeigt). Zudem konnte eine Anhäufung des GFP-Signals an intrazellulären Zell-Zell-Passagen, wo Pilzhypen von einer Pflanzenzelle in die benachbarte Zelle penetrieren, beobachtet werden (Abb. 23). Diese Penetration erfolgt mit Hilfe einer Appressorien-ähnlichen Struktur (Doehlemann et al., 2008b), an dessen apikalen Bereich sich das Fusionsprotein vermehrt sammelte. Die Verteilung des Fluoreszenzsignals innerhalb der Hyphe war dabei nicht gleichmäßig, sondern fleckig, was auf eine vakuoläre Lokalisierung hindeutet.

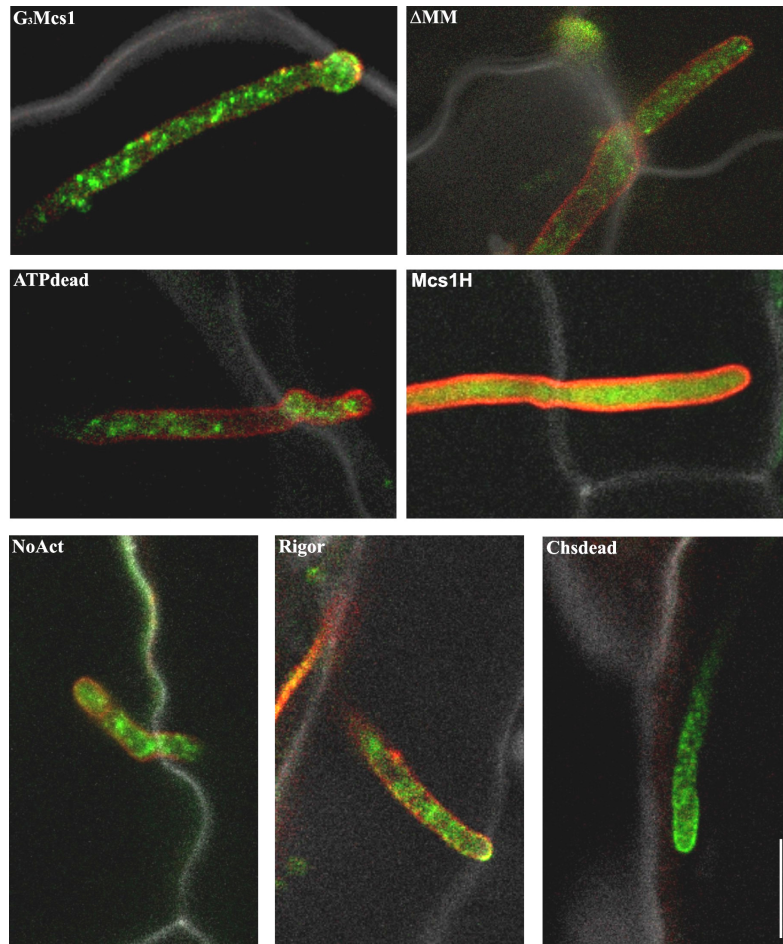


Abb. 23. In planta-Lokalisierung von Mcs1-Mutationsproteinen in infizierten Maisblättern. Bilder wurden 48 Stunden nach der Infektion mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie aufgenommen und zeigen die Lokalisation einer Auswahl der Mcs1-Mutationsproteine in infiziertem Maisgewebe. Die Infektion erfolgte mit einem SG200-Stamm, in der die jeweiligen G₃Mcs1-Derivate (grün) und der an mCherry fusionierten Membranmarker Sso1 (rot) exprimiert wurden (SG200G₃Mcs1_mChSso1, SG200G₃Mcs1^{ΔMM}_mChSso1, SG200G₃Mcs1^{NoAct}_mChSso1, SG200G₃Mcs1^{ATPdead}_mChSso1, SG200G₃Mcs1^{Rigor}_mChSso1, SG200G₃Mcs1^{Chsdead}_mChSso1, SG200G₃Mcs1^{Achs}_mChSso1.). Die Autofluoreszenz der Pflanze ist in grau dargestellt. Größenbalken entspricht 10 μm.

Die in axenischer Kultur nachgewiesenen Lokalisierungen der Mcs1-Mutationsproteine konnten auch für die intrazellulären Filamente bestätigt werden. Wie die Kontrolle G₃Mcs1 zeigten auch die Motordomänen-Mutante G₃Mcs1^{Rigor} und die Chitinsynthase-Mutante G₃Mcs1^{Chsdead} eine Akkumulation des GFP-Signals an der apikalen Wachstumszone der Tochterzellen (Abb. 23). Keine polare Anhäufung konnte jedoch für G₃Mcs1^{ΔMM}, G₃Mcs1^{NoAct}, G₃Mcs1^{ATPdead} und G₃Mcs1H beobachtet werden. Wenngleich man bei G₃Mcs1^{ΔMM}, G₃Mcs1^{NoAct} und G₃Mcs1^{ATPdead} noch einige wenige punktförmige Fluoreszenz-Signale an der Spitze beobachten konnte, erkennt man nach alleiniger Expression des Motorkopfes (G₃Mcs1H) eine gleichmäßige GFP-Verteilung.

2.8 Mcs1-Motilitätsanalysen

Aufgrund der bisher gewonnenen Ergebnisse konnte geschlossen werden, dass die Myosin-Motordomäne für die polare Lokalisierung an der Spitze wachsender Zellen von entscheidender Bedeutung ist. Jedoch konnte keine Aussage getroffen werden, ob die Anlieferung durch die eigene Motordomäne erfolgt oder ob andere molekulare Motoren in diesen Prozess involviert sind. Daher wurden Analysen zur Bewegung von G_3 Mcs1-bindenden Chitosomen mit Hilfe eines auf einen 488nm-Laser-basierendes Mikroskopie-Setup, an der „School of Biosciences“, Exeter, in Zusammenarbeit mit Martin Schuster, durchgeführt.

Aufgrund des schwachen Fluoreszenz-Signals und der relativ starken Hintergrundsignalen innerhalb der Zellen erfolgten die Analysen zur G_3 Mcs1-Bewegung in photo-gebleichten Tochterzellen haploider Sporidien mittlerer Größe. Dabei wurde der gesamte Bereich der Knospe markiert und mit einem 405nm-Laserimpuls gebleicht („bleach“). Die Bewegungen der G_3 Mcs1-Signale, die daraufhin in diesen gebleichten Bereich einwanderten, wurden anschließend durch den speziellen Mikroskopaufbau verfolgt und dargestellt. Eine weit verbreitete Form der graphischen Darstellung von Motilität ist ein Kymograph. Dieser stellt die räumliche Bewegung einzelner Signale in Abhängigkeit von der Zeit dar. Bewegliche Fluoreszenz-Signale erscheinen als diagonale Linien, wohingegen man für stationär verweilende Signale vertikale Linien beobachten kann.

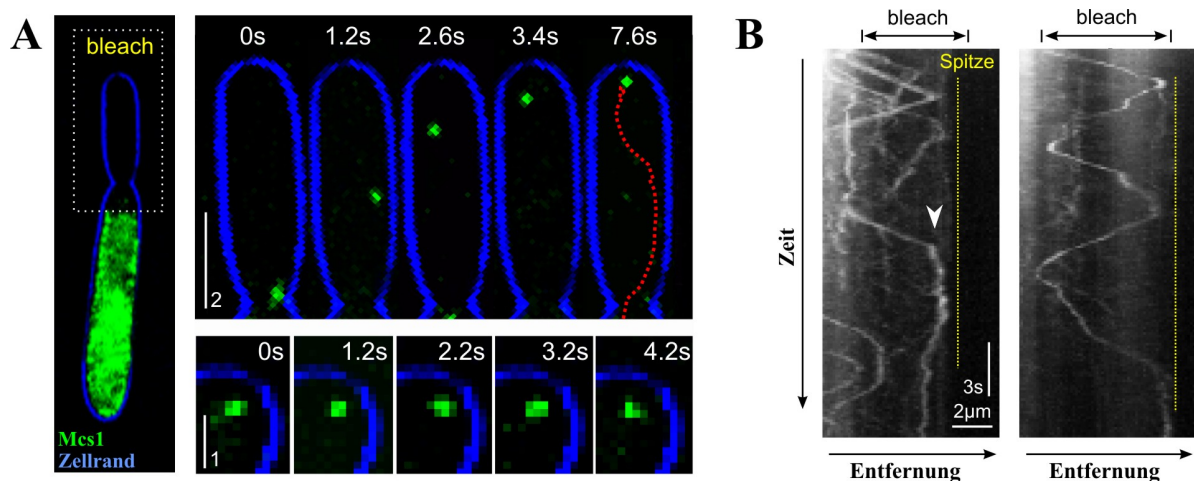


Abb. 24. G_3 Mcs1-Bewegung in Knospen haploider Sporidien. (A) Bilderreihe, die die Motilität von G_3 Mcs1 (grün) in gebleichten Knospen (bleach) zeigt. Die Zelle ist blau umrandet. Das G_3 Mcs1-Signal wandert an einem nicht-linearen Pfad (rote Linie) zum apikalen Bereich und verweilt dort für einige Sekunden (Bilderreihe, unten). Die Größenbalken entsprechen 2 bzw. 1 μ m. (B) Kymographen, die die G_3 Mcs1-Bewegungen in photo-gebleichten haploiden Sporidien zeigen. G_3 Mcs1-Signale bewegen sich bi-direktional und werden schließlich an den Cortex gebunden (Pfeil). Der Größenbalken entspricht drei Sekunden bzw. zwei μ m. (Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit G. Steinberg erstellt.)

Die Bilderreihe in Abb. 24 zeigt ein Beispiel für die Motilität von G₃Mcs1-Signalen (grün) in gebleichten Knospen (bleach). Man erkennt deutlich, dass das beobachtete G₃Mcs1-Signal sich an einem nicht-linearen Pfad zur apikalen Wachstumszone bewegt, um dort gelegentlich für einige Sekunden zu verweilen. Anhand des Kymographs wird die G₃Mcs1-Bewegung veranschaulicht (Abb. 24). G₃Mcs1-Signale bewegen sich bi-direktional, wobei sich die mittlere Geschwindigkeit der anterograden (zur Spitze; $1,54 \pm 0,53$ (n=51)) und der retrograden (zur Mutterzelle, $1,49 \pm 0,45$ (n=51)) Motilität nicht signifikant unterscheidet (Students t-Tests $P=0,6084$; nicht signifikant). Die beobachteten Chitosomen ändern oft mehrere Male die Richtung bevor sie schließlich mit der Plasmamembran fusionieren (Abb. 24, Pfeil). Diese ungewöhnliche bi-direktionale Bewegung konnte auch in nicht photo-gebleichten Zellen beobachtet werden und ist daher keine Folge der Laserbehandlung. Nach Ausbleichen der gesamten Zelle mit Ausnahme des apikalen Bereichs konnte keine retrograde G₃Mcs1-Bewegung visualisiert werden (nicht gezeigt). Dies schließt aus, dass die retrograde G₃Mcs1-Bewegung eine Folge endozytotischer Prozesse ist.

Das detaillierte Verhalten G₃Mcs1-bindender Chitosomen in der Nähe der Plasmamembran wurde zusätzlich in einem Stamm beobachtet, der neben G₃Mcs1 auch das Plasmamembran-gebundene Sso1 exprimiert.

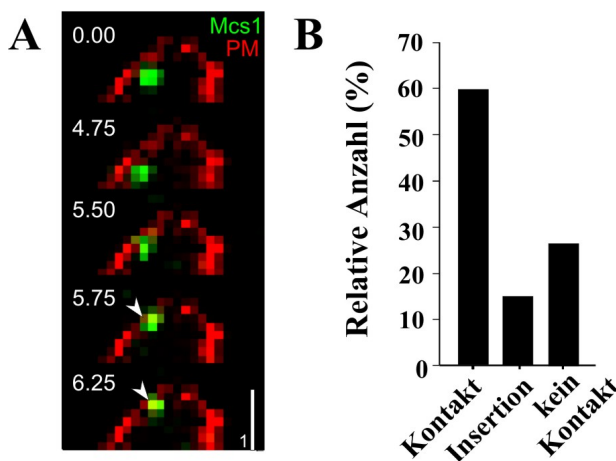


Abb. 25. G₃Mcs1-Verhalten an der Plasmamembran. (A) Die Bilderreihe zeigt das Innehalten und die anschließende Insertion von G₃Mcs1-Signalen (grün) in die Plasmamembran (PM, rot). (B) Das Balkendiagramm zeigt das Verhalten Mcs1-tragender Chitosomen in der Nähe der Plasmamembran. Dargestellt ist die relative Anzahl von Signalen, die Kontakt bzw. in die Membran inseriert werden (n=3, 44 Zellen). (Quantitative Analysen sowie die Darstellung der Ergebnisse erfolgten in Zusammenarbeit mit G. Steinberg.)

Es wurde beobachtet, dass die Mehrzahl der an der Spitze ankommenden Chitosomen nur transienten Kontakt mit der Plasmamembran haben und in weniger als zwei Sekunden zur retrograden Bewegung umkehren (51,1%, n=138). Nur 21% der ankommenden Chitosomen (n=370) verharrten für mehr als 10 Sekunden an der Plasmamembran und nur 18% fusionieren schließlich (Abb. 25, Pfeil). Diese langsame Exozytose-Rate konnte durch Langzeit-Beobachtungen, in denen die Regeneration des G₃Mcs1-Fluoreszenz-Signals nach Photobleaching zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht wurde, bestätigt werden (Abb. 26).

Das Experiment zeigt deutlich, dass die Regenerierung der apikalen G_3Mcs1 -Lokalisation ein lang andauernder Prozess ist, der mehr als 15 min erfordert und nur erfolgt, wenn F-Aktin und die Myosin-Motordomäne anwesend sind. Zerstörung des Aktin-Cytoskeletts hatte keine Akkumulation des Signals an der Spitze zur Folge. Ebenso verhielt es sich in dem Stamm $G_3Mcs1^{\Delta MM}$. Dies bedeutet, dass sowohl das Aktin-Cytoskelett, als auch die Myosin-Motordomäne für eine erfolgreiche polare Regeneration benötigt werden.

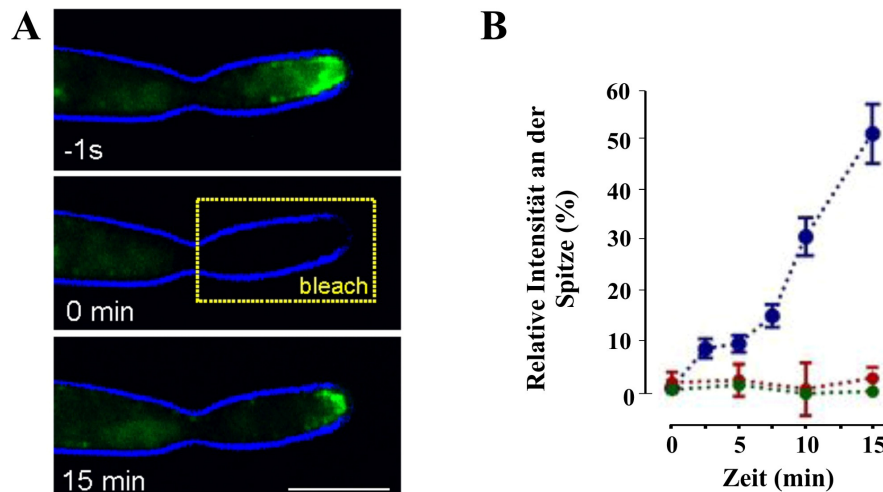


Abb. 26. G_3Mcs1 Fluoreszenz-Regeneration an der apikalen Knospe wachsender Sporidien. Die wachsende apikale Region haploider Sporidien wurde mit einem 405 nm Laser gebleicht und die Regenerationszeit des G_3Mcs1 -Fluoreszenz-Signals gemessen. (A) Graphische Darstellung eines typischen Versuchsablaufs über einen Zeitraum von 15 min. Größenbalken entspricht 5 μ m. (B) Quantitative Analyse der Fluoreszenz-Regeneration in der Knospe G_3Mcs1 -exprimierender Zellen (blau) sowie von Zellen, die mit Latrunculin A behandelt worden waren (grün) und $G_3Mcs1^{\Delta MM}$ -exprimierende Zellen (rot) zu verschiedenen Zeitpunkten. (Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit G. Steinberg erstellt.)

2.9 $G_3Mcs1^{\Delta MM}$ -Motilitätsanalysen

Um schließlich zu testen, ob die Motordomäne für die Motilität der Klasse V Chitinsynthase verantwortlich ist, wurde die Bewegung des $G_3Mcs1^{\Delta MM}$ -Proteins untersucht. Es wurde beobachtet, dass sich $G_3Mcs1^{\Delta MM}$ -bindende Chitosomen ebenfalls bi-direktional, ohne signifikante Unterschiede zwischen G_3Mcs1 und $G_3Mcs1^{\Delta MM}$ in Bezug auf die Geschwindigkeit und die Frequenz der Bewegungen, bewegen (Abb. 27). Letzteres war, wie schon in vorherigen Experimenten bestätigt, abhängig vom Aktin-Cytoskelett bzw. Myosinen. Die Zugabe der Aktin- und Myosin-Inhibitoren Latrunculin A und BDM verursachte eine signifikante Reduktion der Bewegungsfrequenz. Jedoch wurde auch nach Zugabe des Mikrotubuli-Inhibitors Benomyl eine signifikante Abnahme der anterograden Bewegung ermittelt (Abb. 27).

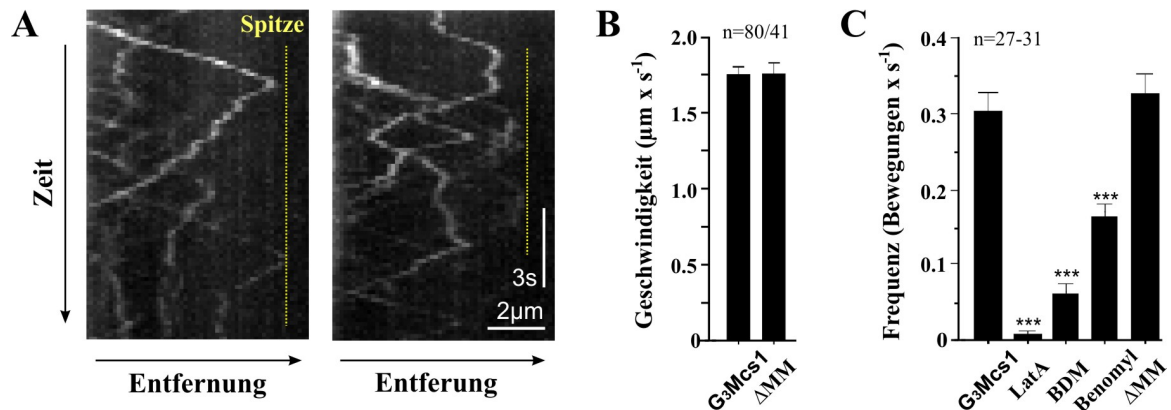


Abb. 27. G₃Mcs1^{ΔMM}-Bewegung in Knospen haploider Sporidien. (A) Kymographen, die die G₃Mcs1^{ΔMM}-Bewegungen in photo-gebleichten haploiden Sporidien zeigten. Größenbalken entspricht 3 Sekunden und 2 μm. (B) Balkendiagramm, das die Geschwindigkeit sich bewegendes G₃Mcs1- und G₃Mcs1^{ΔMM}-Signale zeigt. (C) Das Balkendiagramm zeigt die Häufigkeit anterograder G₃Mcs1-Bewegungen in Zellen, die mit dem Lösungsmittel DMSO (G₃Mcs1), dem Aktin-Inhibitor Latrunculin A (LatA), dem Myosin-Inhibitor BDM oder dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl behandelt wurden sowie die Häufigkeit anterograder G₃Mcs1^{ΔMM}-Bewegungen an. Dreifache Sterne geben die statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (G₃Mcs1) mit $P < 0.0001$ an. Fehlerbalken geben den Mittelwert \pm SEM an. (Quantitative Analysen sowie die Darstellung der Ergebnisse erfolgten in Zusammenarbeit mit G. Steinberg.)

Diese Ergebnisse bringen zum Ausdruck, dass die eigene Myosin-Motordomäne des Fusionsproteins nicht der Motor ist, der die Chitinsynthase-Domäne zur apikalen Wachstumsregion transportiert. Wie Inhibitor-Experimente jedoch gezeigt haben, ist es sehr wahrscheinlich, dass Aktin-abhängige Motoren für die Lokalisierung von Mcs1 eine Rolle spielen. Daher wurde im Folgenden die Rolle der vier in *U. maydis* vorkommenden Myosine für die Mcs1-Anlieferung untersucht.

2.10 Der Einfluss von *U. maydis* Myosinen auf die Mcs1-Anlieferung

Das Genom von *U. maydis* kodiert für vier Myosine, inklusive der Myosin-Chitinsynthase Mcs1 (Klasse XVII) und drei weiterer Myosine, die zu den Klassen I, II und V gehören. Da in anderen Zellsystemen für alle Klassen eine Rolle in der Sekretion beschrieben wurde (Loubery & Coudrier, 2008), wurden die drei *U. maydis*-Myosine bezüglich der Mcs1-Anlieferung untersucht.

Um den Einfluss der *U. maydis* Myosine in der Mcs1-Anlieferung untersuchen zu können wurde zunächst versucht Deletionsmutanten für die Klasse I (Myo1) und II (Myo2) Myosine herzustellen. Eine Deletionsmutante für Myo5 war zum Zeitpunkt dieser Arbeit schon vorhanden (Weber et al, 2003). Für die gezielte Gen-Deletion wurden Plasmide hergestellt mit denen durch homologe Rekombination das jeweilige Gen durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ausgetauscht und somit deletiert werden kann. Es konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine positiven Deletionsmutanten erhalten werden, was auf einen

letalen Effekt der jeweiligen Deletion schließen ließ. Daher sollten alternativ temperatur-sensitive Mutanten hergestellt werden. Analog zu Myo5^{ts} (Weber et al, 2003) wurde versucht, durch Einführen der bekannten Punktmutationen E480K bei Myo1 und E571K für Myo2 Transformanten herzustellen, die nach Wechsel zur restriktiven Temperatur eine Fehlfunktion der entsprechenden Proteine aufweisen. Auch hierbei konnten keine positiven Transformanten identifiziert werden.

In verschiedenen Zellsystemen wurde die Funktion von Myosinen durch die Expression dominant-negativer Domänen ermittelt (Rudolf et al, 2003; Varadi et al, 2005). Dabei wurde die Eigenschaft genutzt, dass diese Protein-Fragmente mit dem endogenen Myosin konkurrieren und die Myosin-Funktion dadurch gehemmt wird. Der Einfluss der *U. maydis* Myosine in der Mcs1-Anlieferung wurde durch zwei unabhängige Experimentansätze untersucht. Dafür wurden dominant-negative Mutanten für die verschiedenen Myosine hergestellt (Abb. 28).

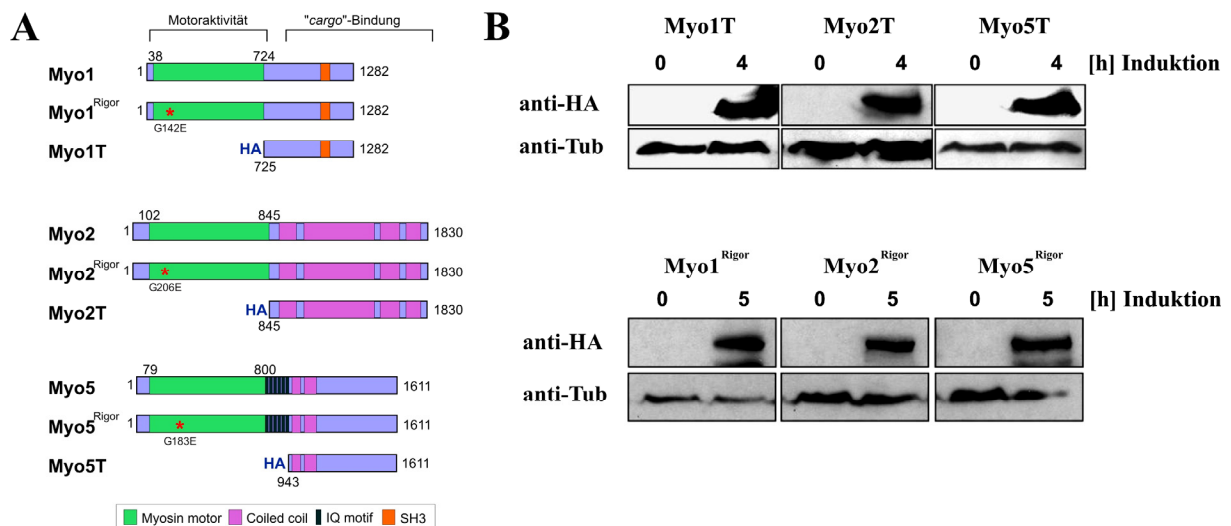


Abb. 28. Domänenstruktur der von *U. maydis* kodierten Myosine und in der Arbeit verwendeten Peptide sowie deren Expression. (A) Domänenanalyse der von *U. maydis* kodierten Myosine (Myo1, Myo2, Myo5) und in der Arbeit verwendeten Konstrukte. (B) Western-Blots, die die Expression der verwendeten Konstrukte nach Mediumwechsel darstellen. Oben: Induzierte starke Expression der Myosin-(„tail“-)Fragmente Myo1T (~62 kDa), Myo2T (~117 kDa) und Myo5T (~81 kDa) nach vier Stunden Wachstum unter induzierenden Bedingungen (Stämme: AB33Mcs1G₃Myo1T, AB33Mcs1G₃Myo2T und AB33Mcs1G₃Myo5T). Unten: Induzierte starke Expression der Myosin-(„Rigor“-)Fragmente Myo1^{Rigor} (G142E; ~145 kDa), Myo2^{Rigor} (G206E; ~212 kDa) und Myo5^{Rigor} (G183E; ~188 kDa) nach fünf Stunden Wachstum unter induzierenden Bedingungen (Stämme: AB33Mcs1G₃Myo1^{Rigor}, AB33Mcs1G₃Myo2^{Rigor} und AB33Mcs1G₃Myo5^{Rigor}). Sowohl die Myosin-(„tail“-) als auch die („Rigor“-)Proteine sind am N-Terminus an Hämagglutinin (HA) fusioniert.

Es wurden Plasmide kloniert, die zum einen für das jeweilige Myosin kodieren und eine Punktmutation im P-loop tragen, was ein permanentes Binden an F-Aktin bewirken kann („Rigor“; vgl. 2.3). Zum anderen wurden Plasmide hergestellt, die für die C-terminale Myosinregion kodieren („tail“). Die Geninduktion erfolgte durch den starken regulierbaren *crg*-Promotor in einem Stamm, der bereits Mcs1G₃ exprimiert (AB33Mcs1G₃).

In Abb. 28A sind die Domänenstrukturen der Myosine Myosin1 (Myo1; Klasse I), Myosin2 (Myo2; Klasse II) und Myosin5 (Myo5; Klasse V) und der in diesem Experiment verwendeten, an einen HA-tag fusionierten, Konstrukte, dargestellt. Zunächst wurde die Proteinexpression mit Hilfe eines HA-Antikörpers getestet. Bereits drei bis fünf Stunden nach Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glukose zu Arabinose konnte für alle Stämme große Proteinmengen nachgewiesen werden (Abb. 28B). Eine erhöhte Proteinmenge nach Induktionszeiten von mehr als fünf Stunden ging mit einem vermehrten Proteinabbau einher (nicht gezeigt). Des Weiteren wurden die durch die Überexpression der dominant-negativen Allele hervorgerufenen phänotypischen Auswirkungen auf die Hyphenmorphologie untersucht. Wie erwartet rief über Nacht die induzierte Genexpression der dominant-negativen Allele starke morphologische Anomalien hervor (Abb. 29). Der induzierte Phänotyp ähnelte im Falle von Myosin5 dem publizierten Myo5-Deletionsphänotyp (Weber et al, 2003). Zu bemerken wäre, dass der Grad der phänotypischen Auswirkungen zwischen den Zellen variierte. Dies weist auf unterschiedliche Proteinlevel innerhalb der untersuchten Zellpopulation hin.

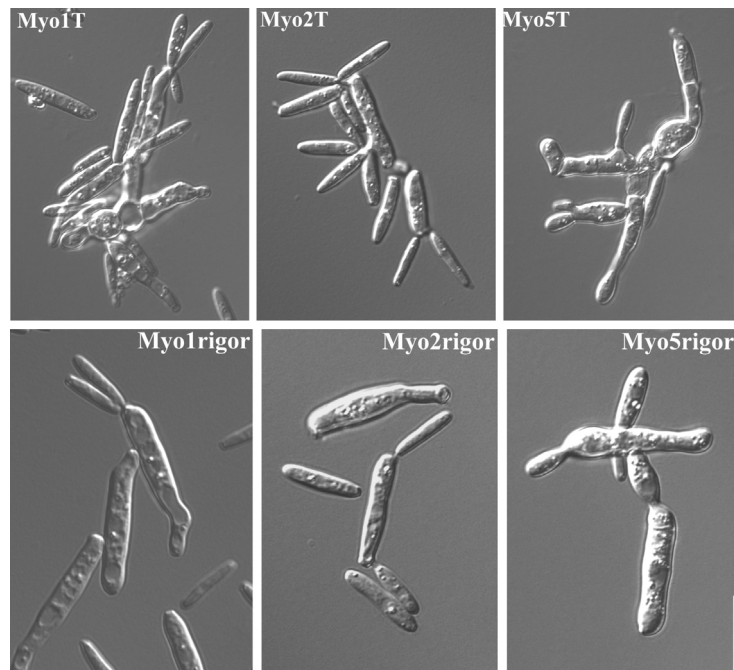


Abb. 29. Einfluss der starken Myosin-„tail“ und „Rigor“-Expression auf die Zellmorphologie. Dargestellt ist der Einfluss der induzierten Expression der Myosin-„tail“ (MyoT) und „Rigor“-Fragmente auf die Zellmorphologie (Stämme: AB33Mcs1G₃Myo1T, AB33Mcs1G₃Myo2T und AB33Mcs1G₃Myo5T sowie AB33Mcs1G₃Myo1^{Rigor}, AB33Mcs1G₃Myo2^{Rigor} und AB33Mcs1G₃Myo5^{Rigor}). Der Grad der phänotypischen Auswirkungen variiert zwischen den Zellen. Der Größenstandard entspricht 10 µM.

Der Einfluss der Expressionen der dominant-negativen Allele auf die Mcs1G₃-Lokalisierung wurde zum einen in den Myosin-„Rigor“-Stämmen und zum anderen in den Myosin-„tail“-Mutanten analysiert.

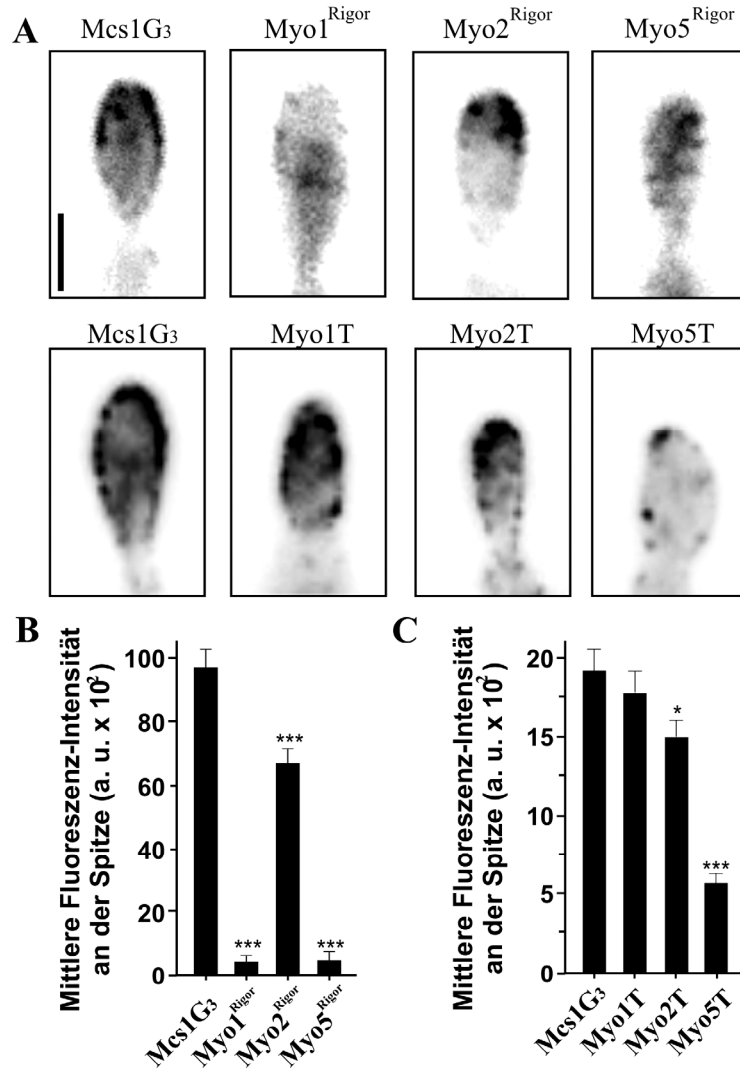


Abb. 30. Die Rolle der *U. maydis* Myosine in der Mcs1-Anlieferung. (A) Mcs1G₃-Lokalisation in der Wachstumsregion in Zellen, die für 4-5 Stunden die „Rigor“ (oben) und „tail“-Allele (unten) exprimieren (Stämme: AB33Mcs1G₃Myo1T, AB33Mcs1G₃Myo2T, AB33Mcs1G₃Myo5T und AB33Mcs1G₃Myo1^{Rigor}, AB33Mcs1G₃Myo2^{Rigor}, AB33Mcs1G₃Myo5^{Rigor}). Größenbalken entspricht 2 μ m. (B) und (C) Balkendiagramm, dass die Mcs1G₃-Lokalisation in der Wachstumsregion in Zellen, die für 4-5 Stunden die „Rigor“ (C) und „tail“-Allele (D) exprimieren, darstellt. Einzelne Sterne geben die statistische Signifikanz zur Kontrolle (Mcs1G₃) von $P < 0.05$, dreifache Sterne von $P < 0.0001$ an. Fehlerbalken geben den Mittelwert \pm SEM an. (Teile der Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit G. Steinberg.)

Man erkennt, dass eine hohe Myo2^{Rigor}-Expression nur einen geringen Effekt auf die polare Mcs1G₃-Lokalisierung hat (Abb. 30A unten, Abb. 30B). Induziert man jedoch die Myo1^{Rigor} und Myo5^{Rigor}-Expression in den Stämmen AB33Mcs1G₃Myo1^{Rigor} und AB33Mcs5G₃Myo1^{Rigor} erkennt man, dass die Mcs1G₃-Akkumulation stark beeinträchtigt ist (Abb. 30A unten, Abb. 30B). Um auszuschließen, dass der Verlust der Mcs1-Polarität eine Folge der Überexpression der Myosinfragmente an sich ist, wurde, analog zu jedem Experiment auch jeweils die gesamte Myosin-Gensequenz ohne Mutation exprimiert. Die zusätzliche Expression der Myosine zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Mcs1-

Akkumulation an der Spitze (nicht gezeigt), so dass ein durch die Überexpression induzierter Verlust der polaren Lokalisierung ausgeschlossen werden konnte.

Durch die Überexpression der „tail“-Konstrukte konnte, im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen, nur der Einfluss von Myosin5 auf die Akkumulation von Mcs1G₃ an der apikalen Wachstumsregion nachgewiesen werden (Abb. 30A oben, Abb. 30C). Beide Experimente weisen daher darauf hin, dass Myosin5 für an der polaren Lokalisierung von Mcs1, beteiligt ist.

2.11 Die Funktion der Motordomäne an der apikalen Plasmamembran

In 2.8 wurde gezeigt, dass G₃Mcs1-gebundene Chitosomen häufig für einige Sekunden an der Plasmamembran verweilen, bevor sie mit dieser fusionieren (Abb. 24, roter Pfeil). Da dieses Verweilen am Apex Aufschluss auf eine mögliche Funktion der Myosin-Motordomäne geben könnte, wurde das Verhalten G₃Mcs1- und G₃Mcs1^{ΔMM}-gebundener Chitosomen untersucht. Dabei zeigten Analysen der G₃Mcs1^{ΔMM}-Bewegungen, dass G₃Mcs1^{ΔMM}-gebundene Chitosomen über signifikant kürzere Zeiträume an der Plasmamembran verweilten als G₃Mcs1-gebundene Chitosomen, bevor sie schließlich zur retrograden Bewegung umkehren.

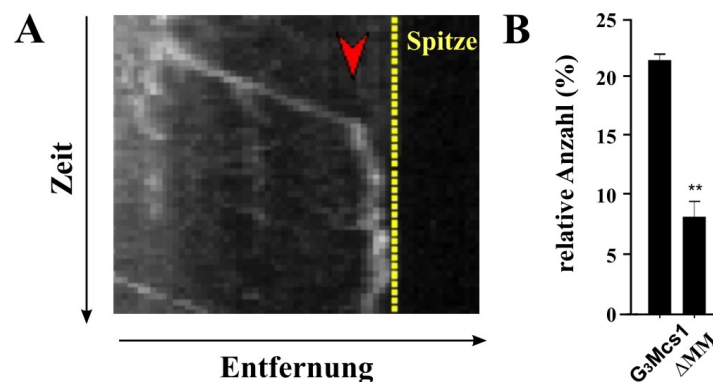


Abb. 31. Verweildauer an der apikalen Plasmamembran. (A) Kymograph, der die G₃Mcs1-Bewegungen in photo-gebleichten haploiden Sporidien zeigt. G₃Mcs1-Signale bewegen sich bi-direktional und werden schließlich an den Cortex gebunden (roter Pfeil). (B) Balkendiagramm zeigt das Verhältnis von Signalen, die länger als 10 Sekunden am Zellcortex verweilen an. Sterne geben statistische Signifikanz zu G₃Mcs1 um P<0.001 an. Fehlerbalken sind als Mittelwert±SEM. (Quantitative Analysen sowie die Darstellung der Ergebnisse erfolgten in Zusammenarbeit mit G. Steinberg. Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Magdalena Martín-Urdíroz.)

Dies wurde besonders für Signale deutlich, für länger als zehn Sekunden an der Spitze detektiert werden konnten. Die relative Anzahl dieser für mehr als zehn Sekunden am Apex verharrenden Chitosomen war in Stämmen, bei denen die Motordomäne deletiert wurde, um mehr als die Hälfte reduziert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Myosin-Motordomäne bei der Fusion oder der Verankerung der Chitinsynthese in der Plasmamembran eine entscheidende Rolle spielt.

2.12 Biochemische Charakterisierung der Myosin-Motordomäne

2.12.1 Heterologe und homologe Proteinexpression

Als Voraussetzung für die biochemische Charakterisierung der Mcs1-Myosin-Motordomäne (MMD) wurde versucht, rekombinantes Mcs1-Protein herzustellen. Für die Proteinexpression wurde zunächst ein *E. coli* Expressionssystem verwendet. Das gewonnene Protein sollte durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Dazu wurde der offene Leserahmen des *mcsI* Gens ohne die Region, die für die Chitinsynthase-Domäne kodiert, in den Expressionsvektor pET15b kloniert (pET15b-Mcs1MMD+linker bzw. pET15b-Mcs1MMD-linker). Die *mcsI*-Sequenz enthielt dabei auch die Sequenz, die für die Linker-Region bis zur ersten Transmembrandomäne, kodiert. Die Expression wurde über einen T7-Promotor mit IPTG induziert und als Expressionsstamm wurden *E. coli* BL21-Zellen verwendet. Leider konnten His-Mcs1MMD+linker und His-Mcs1MMD-linker in nur sehr geringen Mengen produziert werden (nicht gezeigt). Zudem waren beide Fusionsproteine unlöslich. Dadurch wurden Variablen wie die Inkubationstemperatur, IPTG-Konzentration, sowie die Induktionsdauer verändert, was jedoch nicht zu dem gewünschten Ergebnis führte (nicht gezeigt).

Daher wurde zusätzlich versucht, rekombinante Mcs1-Proteine aus *U. maydis* zu gewinnen. Dazu wurden die Stämme FB2Pcrg6xHisMcs1MMD+ und -linker und die Stämme FB2PcrgHAMcs1MMD+ und -linker generiert. Durch Induktion des induzierbaren *crg*-Promotors können Fusionsproteine nach Mediumwechsel zu Arabinose-enthaltendes Medium in großen Mengen in *U. maydis* synthetisiert werden. Auch die Verwendung dieses Expressionssystems und die anschließende Proteinaufreinigung über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie, führten zu keiner erfolgreichen Gewinnung ausreichender Mengen Mcs1MMD-Proteine. Daher wurden für die in 2.12.2 und 2.12.3 beschriebenen Versuche Alternativen zu gereinigtem Protein angewendet.

2.12.2 Charakterisierung der Coiled coil Region mittels Gelfiltration

Ein Charakteristikum verschiedener Myosinklassen ist die Bildung von Dimeren durch so genannte Coiled coil Regionen (Park et al, 2006; Schwaiger et al, 2002). Eine Aminosäure-Sequenzanalyse durch das Programm „Coils2“ (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) ergab, dass die *mcsI*-Linkerregion für eine solche alpha-helikale Struktur kodiert (Abb. 32). Das Programm vergleicht dabei die Mcs1-Proteinsequenz mit Sequenzen, von denen bereits bekannt ist, dass sie in der Lage sind

doppelsträngige Coiled coils zu bilden. Aus einem Ähnlichkeitswert wird dann die Wahrscheinlichkeit für die Bildung eines Coiled coil berechnet (Abb. 32).

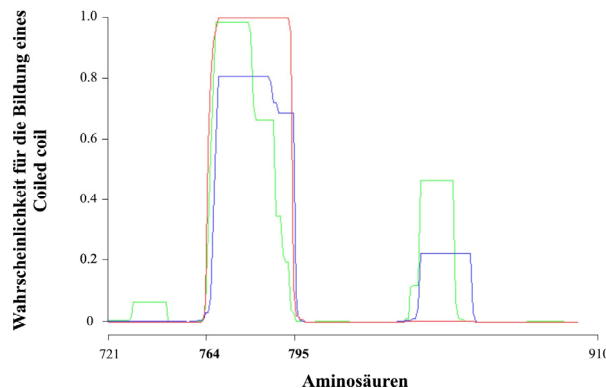


Abb. 32. Graphische Darstellung der „Coils2“-Analyse. Die Coiled coil Region wurde durch eine Proteinsequenzanalyse der As 721 bis 910 der Mcs1-Sequenz durch das Programm „Coils2“ (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) ermittelt. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines Coiled coils berechnet.

Der potentielle dimere Zustand von Mcs1 sollte mittels Gelfiltration untersucht werden. Da eine Aufreinigung rekombinanten Mcs1-Proteins nicht möglich war (vgl. 2.12.1), wurden Gesamtzellextrakte aus *U. maydis* Kulturen analysiert. Dazu wurden die Stämme FB2PcrgHAMcs1MMD+linker und FB2PcrgHAMcs1MMD-linker verwendet. Durch Induktion des induzierbaren *crg*-Promotors durch Mediumwechsel in Arabinose-enthaltendes Medium, erfolgte eine starke Überexpression der gewünschten Gensequenz. Das resultierende rekombinante Fusionsprotein HA-Mcs1MMD+linker (As 1-927) hatte ein vorhergesagtes Molekulargewicht von ~108 kDa. Das erwartete Molekulargewicht von HA-Mcs1MMD-linker (As 1-701) betrug ~83 kDa. Da angenommen wurde, dass die Ausbildung von Dimeren über die identifizierte Coiled Coil Region erfolgt, wurden Unterschiede im Laufverhalten der Proteine in der Gelfiltrationssäule erwartet.

Die einzelnen Fraktionen wurden durch das Äkta-System gesammelt und anschließend durch Western-Blot Analyse auf die Anwesenheit von Mcs1 hin untersucht. Das ungefähre Molekulargewicht der Mcs1-haltigen Fraktionen wurde dabei anhand der Eichgeraden bestimmt (Abb. 33A).

Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen ergab nach Gelfiltrationsläufen mit HA-Mcs1MMD+linker (+ Coiled Coil; ~110 kDa), dass dieses Protein die Eigenschaft besitzt als Dimer zu laufen. Es konnte ein „peak“ ermittelt werden, der einem Elutionsvolumen von $V_e=11,56$ entspricht. Dies wiederum kann einem Molekulargewicht von etwa 230 kDa und somit einem Dimer zugeordnet werden. Ein zweiter „peak“ wurde bei $V_e=12,81$ detektiert. Mit einem berechneten Molekulargewicht von etwa 120 kDa könnte dieser „peak“ einer als Monomer-laufenden Motordomäne zugeordnet werden (Abb. 33B oben).

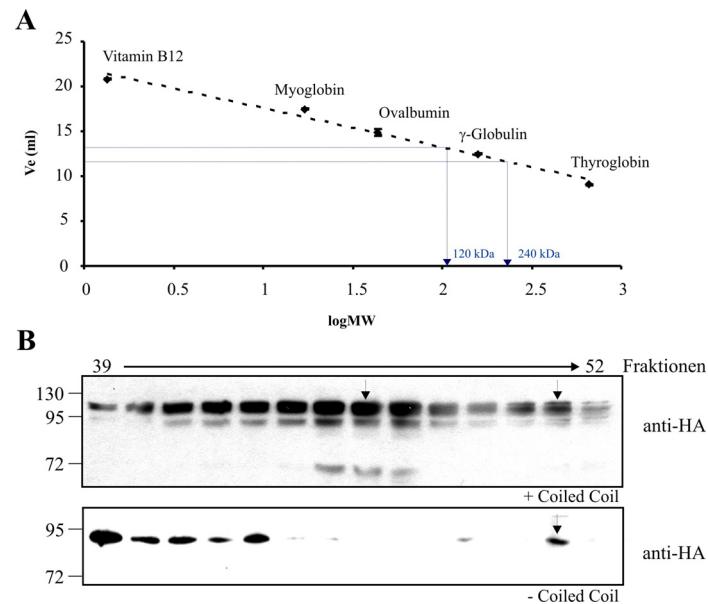


Abb. 33. Bestimmung des Elutionsvolumens der Mcs1MMD +/- linker mittels Gelfiltration. (A) Superdex 200 Kalibrierungskurve mit Angabe der Positionen der verwendeten Standardproteine: Vitamin B12 (1,35 kDa), Myoglobin (17 kDa), Ovalbumin (44 kDa), γ -Globulin (158 kDa) und Thyroglobin (670 kDa). Die Kalibrierung wurde viermal durchgeführt, davon einmal im Hochsalzpuffer. Die blau gefärbten Linien geben die ermittelten Elutionsvolumen für HA-Mcs1MMD+linker, von ~120 kDa bzw. ~240 kDa, an. (B) Western-Blot Analyse der Fraktionen 39 bis 52 eines repräsentativen Gelfiltrationslaufes. Oben: HA-Mcs1MMD+linker (+ Coiled Coil; ~110 kDa): Es sind zwei „peaks“ sichtbar. Der erste „peak“ entspricht einem Elutionsvolumen von 11,56 (~232,6 kDa) was einem Dimer entsprechen könnte. Der zweite „peak“ ist bei einem Volumen von 12,81 (120,9 kDa), das einem Monomer entsprechen könnte. Unten: HA-Mcs1MMD-linker (-Coiled Coil; ~83 kDa): Es ist nur ein „peak“ sichtbar. Dieser entspricht einem Elutionsvolumen von 12,81 (120,9 kDa) und könnte einem Monomer entsprechen.

Um zu überprüfen, ob die Dimerausbildung auch ohne Coiled Coil Region erfolgt, wurden Gelfiltrationsläufe mit der Kontrolle HA-Mcs1MMD-linker (-Coiled Coil; ~83 kDa) durchgeführt. Dies stellte sich als schwierig heraus, da dieses Protein die Eigenschaft besitzt, große Aggregate auszubilden (s. Abb. 33B unten). Um der Aggregatbildung entgegen zu wirken, wurde die *U. maydis* Kultur in einem Hochsalzpuffer aufgenommen und analysiert. Es konnte nur ein „peak“ detektiert werden, was auf ein monomeres Protein hindeuten könnte (Abb. 33B unten).

2.12.3 Untersuchung zur Aktinbindung mittels Co-Sedimentation

Einige Myosine, wie Myo2p aus *S. cerevisiae*, weisen die Eigenschaft auf, in Abwesenheit von ATP fest an F-Aktin zu binden (Reck-Peterson et al, 2001). Im Gegensatz dazu besitzen andere Myosine, wie Myo5a aus *G. gallus* und *M. musculus*, in Anwesenheit von ATP eine hohe Affinität zu Aktin (Reck-Peterson et al, 2001). Takeshita et al. (2005) konnten bereits die Bindung der Myosin-Motordomäne an Aktin an CsmA von *A. nidulans* nachweisen. Um zu überprüfen, ob auch die Mcs1-Motordomäne mit Aktin interagiert und welchen Einfluss die Zugabe von ATP auf die Reaktion hat, wurden Co-Sedimentations-Experimente durchgeführt.

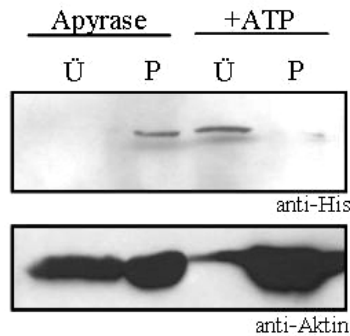


Abb. 34. Überprüfung der Bindung der Mcs1-Myosin-Motordomäne an Aktin mittels Co-Sedimentation. Die Mcs1-Motordomäne incl. Linkerregion (As 1-927) wurde mittels *in vitro* Translation hergestellt und mit Aktin in Ab- und Anwesenheit von ATP ermittelt. Nach der Zentrifugation wurden Aliquots von Überstand (Ü) und im gleichen Volumen gelösten Pellet (P) auf eine SDS-Gel aufgetragen. Mittels Immun-Blot wurden die Motordomäne (anti-His) und Aktin (anti-Aktin) mit den entsprechenden Antikörpern detektiert.

Da, wie oben beschrieben, die verschiedenen Versuche zur Aufreinigung rekombinanter Myosin-Motordomänen nicht durchführbar waren, wurde das Mcs1-Motorprotein mit Hilfe des „TNT® Quick Coupled Transcription/Translation“ Systems zellfrei synthetisiert (s. 4.12). Das System beinhaltet alle Komponenten für eine erfolgreiche gekoppelte Transkription/Translation in einem Retikulozyten Lysat. Da die *in vitro* RNA-Synthese durch eine T7 RNA Polymerase erfolgt, wurde das Plasmid pET15b-Mcs1MMD+linker, das einen T7-Promotor enthält, verwendet. Das *in vitro* Translationsprodukt wurde nach der Durchführung auf Expression, Menge des synthetisierten Proteins und Löslichkeit nach einstündiger Zentrifugation bei 100.000 g mittels Western-Blot Analyse überprüft. Es konnten nur sehr geringe Mengen des Proteins 6xHis-Mcs1MMD+linker mit Hilfe des Systems synthetisiert werden, jedoch war die gesamte hergestellte Proteinmenge löslich (nicht gezeigt), so dass die Co-Sedimentationsexperimente durchgeführt werden konnten. Das für den Versuch benötigte F-Aktin wurde mit Hilfe des „Actin Binding Protein Biochem Kits“ nach Herstellerangaben hergestellt. Anschließend wurde das nach Ultrazentrifugation erhaltende F-Aktin-Pellet in einem ATP-freien Puffer resuspendiert. Dieser Puffer enthielt Phalloidin, ein hochtoxisches Alkaloid des weißen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*). Durch dessen Zugabe wird die Depolarisierung der Aktin-Filamente gehemmt und somit Aktin in Abwesenheit von ATP stabilisiert (<http://en.wikipedia.org/wiki/Phalloidin>).

Nach Co-Inkubation des synthetisierten Proteins mit F-Aktin in Anwesenheit von Apyrase, einem Enzym, das die Hydrolyse von ATP in AMP und anorganisches Phosphat katalysiert, bzw. ATP, wurde der Reaktionsansatz nach Ultrazentrifugation in eine Überstand und eine Pellet-Fraktion getrennt. Da die Mcs1-Motordomäne am N-terminalen Bereich an einen 6-fachen Histidinrest fusioniert war, konnte die Gegenwart von 6xHis-Mcs1MMD+linker im Überstand oder der Pellet-Fraktion mittels Western-Blot Analyse nachgewiesen werden. Die Bindung der Myosin-Motordomäne an phalloidin-stabilisiertes F-Aktin wurde in allen durchgeführten Experimenten erfolgreich nachgewiesen (Abb. 34). Versuche zum Einfluss von ATP auf die Aktinbindung zeigten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Zum einen

konnte, wie in dem repräsentativen Western-Blot dargestellt (Abb. 34), die Ablösung des Myosinkopfes vom Aktin-Filament in Anwesenheit von ATP ermittelt werden. Zum anderen, wurde in anderen Versuchsansätzen die feste Bindung an F-Aktin, trotz Zugabe von ATP, beobachtet (nicht gezeigt).

3 DISKUSSION

3.1 Sowohl die Mcs1 Motor- als auch die Chitinsynthase-Domäne sind für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* essentiell

Klasse V Chitinsynthasen sind bedeutende Virulenzfaktoren, die sowohl für die pathogene Entwicklung phytopathogener Pilze, wie *F. oxysporum* (Madrid et al, 2003), *C. graminicola* (Werner et al, 2007), *G. zeae* (Kim et al, 2009) und *U. maydis* (Weber et al, 2006), als auch in humanpathogenen Pilzen, wie *W. dermatitidis* (Liu et al, 2004), eine essentielle Rolle spielen. BcChsV aus *Botrytis cinerea* ist die einzige bisher veröffentlichte Klasse V CHS eines phytopathogenen Pilzes, bei der die entsprechende Gen-Deletion die Virulenz nicht beeinflusst (Cui et al, 2009).

Studien zur Untersuchung der Funktion dieser Pathogenitätsfaktoren wurden ausnahmslos mit Hilfe von Deletionsmutanten gemacht, so dass bisher ungeklärt blieb, welcher Bereich des Myosin-Chitinsynthase Fusionsproteins für die pathogene Entwicklung verantwortlich ist. Unter der Annahme, dass die Mcs1-Motordomäne zur polaren Anlieferung von Chitosomen beiträgt, waren zwei Möglichkeiten vorstellbar, wie die einzelnen Domänen die Pathogenität beeinflussen könnten. Zum einen könnte die Chitinsynthase-Aktivität durch kontinuierliche Zellwandsynthese zur Aufrechterhaltung der Zellwand-Integrität während der Penetration und dem intrazellulären Wachstum beitragen. Zum anderen war denkbar, dass die Mcs1-Motordomäne die Infektion durch die anterograde Anlieferung von Chitosomen, die unbekannte wichtige Pathogenitätsfaktoren, wie sekretierte Enzyme, enthalten, begünstigt.

Um die genannten Möglichkeiten zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zunächst zwei Aminosäurereste, von denen experimentell gezeigt werden konnte, dass sie für die enzymatische Aktivität von Chs2p aus *S. cerevisiae* essentiell sind (Nagahashi et al, 1995b), in der Chitinsynthase (CHS)-Domäne von Mcs1 ausgetauscht. Die Rolle der Myosin-Motordomäne (MMD) wurde durch verschiedene Mutationen und Deletionen, von denen der Einfluss auf die Myosin Funktion bereits aus orthologen Proteinen bekannt war, in die für die MMD kodierende Region eingeführt und die erhaltenen Mutationsstämme funktionell charakterisiert (vgl. Kapitel 2.3 und 2.4). Wie bereits in Weber et al. (2006) beschrieben, arretierten SG200 Δ mcs1 Penetrationshyphen, meist direkt nach dem Durchdringen der Pflanzenoberfläche in den ersten Epidermiszellen und bildeten dort ballonartige und geschwollene Strukturen aus. Interessanterweise sind die in der Chitinsynthase-Aktivität gestörten Mutanten in allen getesteten Parametern phänotypisch nicht von *mcs1*-Deletionsmutanten zu unterscheiden. Daraus lässt sich schließen, dass die starke

Einschränkung der Virulenz auf den Verlust der Chitinsynthase-Aktivität zurückzuführen ist. Dagegen zeigten Infektionen mit Stämmen, die in der Funktionalität der MMD beeinträchtigt waren, einen intermediären Phänotyp. Obwohl die $\Delta mcs1$ -typischen abnormalen Hyphenstrukturen beobachtet wurden, konnten die MMD-Mutanten den apathogenen SG200 $\Delta mcs1$ Phänotyp teilweise komplementieren und zeigten eine gemäßigte Proliferation innerhalb des Maisgewebes sowie vereinzelte Tumorbildung. Die Verbreitung in der Pflanze war jedoch stark reduziert und intrazelluläre Hyphen wiesen ein unregelmäßiges Wachstum auf. Aufgrund der Abwesenheit bzw. des Funktionsverlustes der Myosin-Motordomäne könnte es zu einer Beeinträchtigung der Anlieferung oder Verankerung von Mcs1 kommen. Eine Folge daraus wäre beispielsweise eine Fehlverteilung von Zellwandmaterial, wie Chitin, und ein unregelmäßiger Wachstumsphänotyp. Aus den ermittelten Ergebnissen lässt sich schließen, dass sowohl die Myosinmotor- als auch die Chitinsynthase-Domäne von Mcs1 für die Pathogenität des Fusionsproteins eine wichtige Rolle spielen. Die Funktionen der jeweiligen Untereinheiten sind jedoch unterschiedlich, da Infektionen mit MMD-Mutationsstämmen im Gegensatz zu CHS-Mutationsstämmen den apathogenen Phänotyp der Deletionsmutante teilweise komplementieren können. Dies unterstützt die Hypothese, dass der MMD in der Anlieferung von Mcs1 an die Hyphenspitze und der CHS-Domäne für die Zellwandsynthese am Zielort eine bedeutende Rolle zukommt. Diese Beobachtungen schließen jedoch einen passiven Transport anderer für die Virulenz essentieller Faktoren durch transportierte Chitosomen nicht aus. Es wäre möglich, dass die Mcs1-Motordomäne die Anlieferung von Chitosomen zur Wachstumszone oder die Fusion der Vesikel kontrolliert, die Pathogenitätsfaktoren beinhalten, die nach dem Verschmelzen mit der Plasmamembran funktionell aktiv werden. Beispiele für passiv transportierte Proteine könnten andere Chitinsynthasen, wie die Chitinsynthase 6, sein, von denen schon in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass sie für die Pathogenität eine bedeutende Rolle spielen (Garcera-Teruel et al, 2004; Weber et al, 2006). Alternativ könnten auch einige der kürzlich identifizierten sekretierten Effektoren (Kämper et al, 2006), von denen angenommen wird, dass sie für den Schutz des Pilzes und die Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktion eine Rolle spielen, als „cargo“ durch Mcs1 angeliefert werden. Um potentielle passiv transportierte Kandidaten zu ermitteln, könnten massenspektrometrische Analysen gereinigter, Mcs1-bindender Chitosomen durchgeführt werden. Die Aufreinigung dieser Chitosomen könnte beispielsweise durch die Weiterentwicklung der schon in den 70er Jahren entwickelten Methode zur Isolierung von Chitosomen aus Zell-freien Pilzextrakten möglich werden (Bracker et al, 1976; Ruiz-Herrera et al, 1977).

3.2 Mcs1-Mutanten können keine kompatible Interaktion mit *Z. mays* etablieren

Pflanzen sind stetig einer gewaltigen Anzahl an Pathogenen ausgesetzt, die jedoch in den meisten Fällen vom Immunsystem erfolgreich abgewehrt werden (Dangl & Jones, 2001; De Wit, 2001). Die angeborene Immunantwort stellt die erste Barriere gegen das Eindringen von Krankheitserregern dar. Wie Tiere haben auch Pflanzen die Fähigkeit erworben, verschiedenste für Mikroorganismen charakteristische PAMPs („pathogen associated molecular patterns“) bzw. Elicitoren zu erkennen (Nürnberger et al, 2004) und eine schnelle pflanzliche Abwehrreaktion, wie den so genannten „oxidative burst“ einzuleiten. Dieser bewirkt die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, „reactive oxygen species“), die zum einen die eindringenden Organismen direkt angreifen zum anderen aber auch gleichzeitig den Zelltod der betroffenen Pflanzenzelle hervorrufen können (Lamb & Dixon, 1997; Levine et al, 1994). Die Anreicherung von ROS ist eine nicht-spezifische Abwehrreaktion, die von PAMPs, wie dem Chitin der pilzlichen Zellwand, induziert wird (Eckardt, 2008; Nürnberger & Brunner, 2002; Nürnberger et al, 2004; Nurnberger et al, 2004). Während nicht-angepasste Pathogene durch diesen Abwehrmechanismus erfolgreich abgewehrt werden, sind wirtsspezifische Krankheitserreger in der Lage, die Immunantwort der befallenen Pflanze, beispielsweise durch die Sekretion von Effektorproteinen, zu unterdrücken (Jones & Dangl, 2006). *U. maydis* bildet eine wirtsspezifische, biotrophe Interaktion mit Mais aus und kolonisiert die lebende Pflanzenzelle, wobei die pflanzliche Abwehrreaktion aktiv unterdrückt wird (Doehlemann et al, 2008b; Kämper et al, 2006). Ein Grund für den apathogenen Phänotyp des *mcs1*-Deletionsstammes und der Chitinsynthase-defekten Mutante könnte eine im Vergleich zu SG200 Infektionen stark induzierte Abwehrreaktion sein, die zum Arrest des Hyphenwachstums innerhalb der oberen Zellschichten des Maisgewebes führt (vgl. Kapitel 2.4). Das Pflanzengewebe wurde in Infektionen mit SG200Δ*mcs1* und SG200G₃*Mcs1*^{CHS^{dead}} zwar stellenweise penetriert, jedoch erfolgte 24-36 Stunden nach der Infektion eine starke Induktion von Pflanzenabwehrreaktionen, wie der Akkumulation von H₂O₂ um Hyphen abnormal wachsender SG200Δ*mcs1*- und SG200G₃*Mcs1*^{CHS^{dead}}-Mutanten (vgl. 2.4.1). Selten zeigten auch G₃*Mcs1*-exprimierende Hyphen geringfügige Abwehrreaktionen an den Hyphenspitzen (nicht gezeigt); subapikale Zellabschnitte wiesen hingegen keine DAB-Präzipitate auf, was auf eine Rolle von Zellwandumstrukturierungen für die Etablierung der biotrophen Interaktionszone spielen könnten (O'Connell & Panstruga, 2006). Die Umstrukturierung der Zellwand kann in den untersuchten Mutanten möglicherweise nicht mehr erfolgen, so dass die biotrophe Interaktion nicht mehr erfolgreich ausgebildet werden kann. Zudem sind sphärisch wachsende *mcs1*-Deletionsmutanten und

SG200G₃Mcs1^{CHS_{dead}}-Hyphen nicht in der Lage, polares, fokussiertes Spitzenwachstum aufrecht zu erhalten. Dies resultiert in geschwollenen Hyphen und ruft eine verstärkte Pflanzenabwehr hervor. Daraus lässt sich folgern, dass die eingeführten Mutationen *U. maydis* in ein nicht-kompatibles Pathogen umwandeln, das durch unspezifische Abwehrreaktionen, wie der Freisetzung von ROS, erfolgreich abgewehrt wird.

Eine morphologische Charakterisierung pilzlicher Klasse V CHS Deletionsmutanten während der pathogenen Entwicklung innerhalb der Wirtspflanze wurde bislang kaum beschrieben. Neben Weber et al. (2006) zeigten lediglich Werner et al. (2007), dass, ähnlich zur *U. maydis* *mcsI*-Deletionsmutante, nach Infektion mit *C. graminicola* *CgchsV*-Deletionsstämmen, sphärisch geformte Strukturen innerhalb des Pflanzengewebes zu beobachten sind (Werner et al, 2007). Eine Erklärung wäre, dass die auffälligen morphologischen Defekte intrazellulär wachsender Hyphen von *U. maydis* *mcsI*-Deletionsmutanten und G₃Mcs1^{CHS_{dead}}-exprimierenden Stämmen eine Folge der verstärkten Pflanzenabwehr sind. Untersuchungen an *U. maydis* Yap1, einem wichtigen Transkriptionsfaktor, der bei der Reaktion auf oxidativen Stress eine zentrale Rolle spielt, sprechen jedoch gegen diese Hypothese. Infektionen mit *yap1*-Deletionsstämmen riefen, ähnlich wie *mcsI*-Deletionsmutanten, einen “oxidative burst” und pflanzlichen Zelltod hervor, ohne jedoch phänotypische Veränderungen zu bewirken (Molina & Kahmann, 2007). Daher ist es wahrscheinlicher, dass sowohl die Deletion der CHS als auch die Inaktivierung der enzymatischen Aktivität eine Reduktion oder Fehlverteilung von Chitin in der Zellwand hervorruft. Der resultierende Verlust der Zellwand-Integrität könnte zu den beobachteten morphologischen Defekten führen und das gestörte Hyphenwachstum dadurch die Verbreitung des Pilzes innerhalb der Pflanze verlangsamen. Weber et al. (2006) zeigten bereits, dass der Chitinanteil in der pilzlichen Hyphe durch die Deletion der Klasse V CHS signifikant reduziert ist. Ein verringerter Chitinanteil ist auch für SG200G₃Mcs1^{CHS_{dead}}-Hyphen zu erwarten; die experimentellen Beweise dafür müssten jedoch noch erbracht werden. Durch Mutationen in der CHS-Domäne hervorgerufene veränderte Chitinanteile der pilzliche Zellwand, könnten zu veränderten Oberflächenstrukturen mutierter *mcsI*-Hyphen führen. Da die pilzliche Zellwand eine vielschichtige Struktur aus Chitin, Glukanen und anderen Polymeren ist, dessen Komponenten durch komplexe Quervernetzungen miteinander verknüpft sind (Adam, 2004), können Veränderungen im Chitinanteil zu Zellwandumstrukturierungen führen. Eine Folge wäre beispielsweise ein erhöhter β -1,3-Glukananteil (Mellado et al, 2003). Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellwandkomponenten könnten daher gravierenden Einfluss auf die Pilz/Pflanze Interaktion hervorrufen (Ruiz-Herrera et al, 2006a). Über den Aufbau der

Zellwand intrazellulär wachsender Infektionsstrukturen biotropher Pilze ist bisher nur wenig bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass einige phytopathogene Pilze Mechanismen entwickelt haben, der Erkennung durch den Wirt zu entgehen. Dies kann u. a. durch Zellwandmodifikationen während des Wachstums innerhalb der Pflanze erfolgen (O'Connell & Panstruga, 2006). Da Polysaccharide in der pilzlichen Zellwand, wie beispielsweise Chitin, PAMPs darstellen, können diese durch Oberflächenrezeptoren der Pflanzenzelle erkannt werden und die basale Abwehrantwort der Pflanze aktivieren (Nürnberger et al, 2004). Für biotrophe Pilze, wie *U. maydis*, wäre es daher von Vorteil, die Exposition dieser Zellwandbestandteile während des *in planta* Wachstums zu minimieren bzw. diese zu modifizieren. Cytochemische Untersuchungen an Lektinen haben gezeigt, dass Chitin in der Zellwand von jungen Rost-Haustorien und jungen intrazellulären Hyphen, an Stellen wo das Pathogen den ersten Kontakt mit der Plasmamembran der Wirtszelle aufnimmt, tatsächlich abwesend oder unzugänglich ist (O'Connell & Panstruga, 2006; O'Connell RJ, 1990). Ursache dafür könnten Chitin-Deacetylasen sein, die vorhandenes Chitin in Chitosan umwandeln können, so dass der Pilz in wichtigen frühen Stadien intrazellulären Wachstums einer Lyse durch pflanzliche Chitinasen entgehen kann (El Gueddari, 2002; Siegrist & Kauss, 1990; Zhao et al, 2010). Im Widerspruch dazu steht allerdings, dass auch Chitosan als PAMP beschrieben wurde (Agrawal, 2002). Zellwandveränderungen in *Mcs1*-Mutanten könnten dazu führen, dass schützende Zellmodifikationen nicht mehr vorhanden sind oder der Pilz vermehrt Elicitoren freisetzt oder zugänglich macht. Dies führt zur Erkennung durch die Pflanze und zur erfolgreichen Abwehr des Pilzes. Hinweise auf eine gestörte Zellwandzusammensetzung durch Deletionen pilzlicher Klasse V CHS kommen auch aus Untersuchungen *Mcs1*-ähnlicher Chitinsynthasen anderer Organismen, wie z. B. *B. cinerea* und *F. oxysporum*, in denen eine erhöhte Sensitivität gegenüber induzierten Stressbedingungen beobachtet werden konnte (Cui et al, 2009; Madrid et al, 2003). *BcchsV*-Deletionsmutanten in *B. cinerea* zeigten beispielsweise eine erhöhte Sensitivität in Anwesenheit von Calcofluor-Weiß, jedoch eine gesteigerte Toleranz gegenüber Zellwandzerstörenden sowie osmotisch-stabilisierend wirkenden Substanzen, wie SDS, Sorbitol und NaCl (Cui et al, 2009). Zellwandstress induzierende Substanzen, wie Calcofluor und Kongorot (Mrsa & Tanner, 1999; van der Vaart et al, 1995), führten auch bei SG200Δ*mcs1* und den *mcs1*-Mutationsstämmen zu einer deutlichen Wachstumsreduktion, wobei besonders *mcs1*-Deletionsmutanten, SG200G₃*Mcs1*^{Chsdead} und SG200G₃*Mcs1*^{ACC} eine signifikant reduzierte Toleranz aufwiesen (vgl. Abb. 10). Eine gesteigerte Toleranz gegenüber osmotisch-

stabilisierend wirkenden Substanzen, wie Sorbitol und NaCl, konnte jedoch in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Anhaltspunkte für eine verstärkte Sensitivität von Klasse V CHS Mutanten gegenüber der pflanzlichen Abwehr kommen aus Untersuchungen an einer Mcs1-ähnlichen CHS aus *F. oxysporum*. Deletionsmutanten zeigten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber pflanzlichen antimikrobiellen Abwehrstoffen, wie dem Phytoanticipin alpha-tomatin und H₂O₂. Dies könnte bedeuten, dass Klasse V CHS gegen pflanzliche Abwehrmechanismen schützen können (Madrid et al, 2003). Obwohl *mcs1*-Deletionsmutanten sowie G₃Mcs1^{CHSdead}- und G₃Mcs1^{ACC}-exprimierende Stämme ein stark vermindertes Wachstum unter Zellwandstress-induzierenden Wachstumsbedingungen zeigten, konnte bei oxidativem Stress durch die Zugabe von H₂O₂ kein Wachstumsphänotyp beobachtet werden. Dies könnte jedoch an den Versuchsbedingungen liegen, da *U. maydis* auf den verwendeten Agarplatten in Form von haploiden Sporidien wächst. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich die Zellwandzusammensetzung zwischen Hefe-artigem und infektiösem filamentösem Wachstum unterscheidet. Die Sensitivität von Mcs1-Mutanten bezüglich oxidativem Stress könnte daher z. B. auf Aktivkohle-haltigen Agarplatten, die die Ausbildung von b-Hyphen induzieren, erneut getestet werden.

Eine Zellwandbestandteilanalyse (Taylor & Cameron, 1973) der einzelnen Mutanten während des intrazellulären Wachstums könnte Aufschluss über Veränderungen in der Zusammensetzung der *U. maydis* Zellwand geben. Dies könnte zur Klärung beitragen, ob die Erkennung der *mcs1*-Mutanten durch das pflanzliche Abwehrsystem und die verstärkt induzierte Abwehrreaktion die Folge der gestörten Entwicklung intrazellulärer Hyphen, der erhöhten Sensitivität gegenüber pflanzlichen Abwehrstoffen, wie ROS, und/oder einer unzureichenden Unterdrückung der Pflanzenabwehr ist.

Akkumulationen von ROS, wie H₂O₂, gehen meist einer hypersensitiven Pflanzenreaktion voraus, bei der es zum kontrollierten Absterben der attackierten Pflanzenzellen kommt (Hückelhoven et al, 1999; von Ropenack et al, 1998). Die fehlende Ausbildung einer biotrophen *U. maydis*/*Z. mays* Interaktion führt zum Kollabieren der befallenen Maisepidermiszellen, wodurch es zur Auflösung intakter Membranstrukturen kommt, die durch FM4-64-Färbungen nachgewiesen werden können (Doehlemann et al, 2008a). Das Absterben infizierter Regionen als Folge einer hypersensitiven Antwort auf Infektionen mit *mcs1*-Deletionsmutanten konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. In mit *mcs1*-Mutanten infizierten Bereichen, wurde die für sterbende Zellen typische Bildung multipler Vesikel beobachtet werden. Erwartungsgemäß erkennt man in mit SG200Δ*mcs1* und

SG200G₃Mcs1^{CHS_{dead}} infizierten Blattabschnitten nur das lokale Absterben einzelner penetrierter Zellen. Blättern, die mit SG200G₃Mcs1^{ΔMM} infiziert wurden, wiesen jedoch größere abgestorbene Areale auf. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass bei Infektionen mit SG200Δmcs1 und SG200G₃Mcs1^{CHS_{dead}} eine hypersensitive Antwort ausgelöst wird, die zu einem lokalen Absterben einzelner infizierter Zellen führt, wohingegen die durch SG200G₃Mcs1^{ΔMM}-induzierte hypersensitive Reaktionen zum Absterben größerer Infektionsbereiche kommt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese Mutanten im Gegensatz zu den apathogenen Δmcs1- und G₃Mcs1^{CHS_{dead}}-Stämmen noch in der Lage sind das Pflanzengewebe teilweise zu kolonisieren. Das makroskopisch erkennbare Kollabieren infizierten Pflanzengewebes kann ebenfalls durch die hypersensitive Reaktion der Zellen erklärt werden. Da jedoch meist nur die oberen Pflanzenzellen betroffen waren, kam es nur selten zu größeren nekrotischen Läsionen.

Ein genauerer Einblick in die Abwehrreaktionen, die durch die Infektionen verschiedener Mcs1-Mutanten ausgelöst werden, sollte durch Expressionsanalysen ausgewählter Maisgene gewonnen werden (vgl. 2.4.3). Da unterschiedlich stark induzierte Pflanzenabwehrreaktionen beobachtet wurden, sollten diese Unterschiede erwartungsgemäß auch in den gezielten Transkriptionsanalysen der untersuchten Maisabwehrgene mittels qPCR sichtbar werden (vgl. 2.4.3). Zu keinem Zeitpunkt konnten jedoch signifikante Veränderungen im Expressionsmuster der Maisgene zwischen den untersuchten Stämmen ermittelt werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass, wie in Abb. 13 sichtbar und mittels qPCR quantitativ verifiziert (vgl. 2.3.3), die Pilzmenge im infizierten Blattgewebe nach Infektion mit SG200G₃Mcs1^{ΔMM} und SG200Δmcs1 im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert ist. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Mutanten schon in extrazellulären Stadien auf der Pflanzenoberfläche, wie der Ausbildung oder Funktionalität von Appressorien oder während der frühen Penetrationsphasen, gravierende Defekte aufweisen könnten. Diese würden zu einer stark verringerten Anzahl an Penetrationsereignissen, auf die eine Abwehrreaktion erfolgen kann, führen. Da auch in frühen Infektionsstadien nach SG200 Infektionen eine transiente Abwehrreaktionen, die einer PAMP-vermittelten Abwehrreaktion gleichen, induziert wird (Doehlemann *et al.*, 2008b), könnte der Verdünnungseffekt zu groß werden. Dies könnte die fehlenden Unterschiede zwischen Infektionen mit Mcs1-Mutanten und Kontrolleinfektionen erklären. In einigen Veröffentlichungen wurde bereits die Rolle der Klasse VII CHS aus *M. grisea*, CHS7, für Ausbildung funktioneller Appressorien bestätigt (Odenbach *et al.*, 2009). Auch die Deletion der Mcs1-ähnlichen Klasse V CHS CgChsV aus *C.*

graminicola führte zu desintegrierten, nicht-funktionellen Appressorien (Werner et al, 2007). Um zu testen, ob dies auch für Mcs1 zutrifft, müsste der Anteil Appressorien-differenzierender Hyphen ermittelt werden. Um Appressorien auf der Blattoberfläche zu detektieren, könnte ein „Appressorienmarker“ verwendet werden (Mendoza-Mendoza et al, 2009). Dieser Marker basiert auf einer Fusion von *3xegfp* an den Promotor des Gens *um01779* (*P_{um01779}3xegfp*). Die Genexpression wird dabei spezifisch in Hyphenspitzen, die Appressorien ausdifferenzieren, induziert, und die Identifizierung von Appressorien wird so erheblich vereinfacht.

3.3 Die polare Lokalisation von Mcs1 ist abhängig vom Acto-Myosin-System

Pilzliche Hyphen zeigen ein gerichtetes Wachstum an der Hyphenspitze, wo die Sekretion von Proteinen und Vesikeln mit der Plasmamembran, sowie die Synthese von Zellwandkomponenten, wie Glukanen und Chitin, erfolgt (Steinberg, 2007a). Chitin ist ein Hauptbestandteil der pilzliche Zellwand und wird durch Chitinsynthasen synthetisiert. Entsprechend ihrer Rolle im Spitzenwachstum lokalisieren diese Enzyme unter anderem in der apikalen Plasmamembran und in Chitosomen in der Nähe des Spitzenkörpers (Amnuaykanjanasin & Epstein, 2006; Fukuda et al, 2009; Riquelme et al, 2007; Ruiz-Herrera et al, 2006b; Takeshita et al, 2005; Weber et al, 2006; Werner et al, 2007). Es wird weitläufig angenommen, dass Komponenten des Cytoskeletts den Transport der Chitosomen vermitteln, und der Langstreckentransport über Mikrotubuli und kürzere Wege zur Zellperipherie über das Aktin-Cytoskelett erfolgen (Brand & Gow, 2009). Beispielsweise wird der mögliche anterograde Transport der Klasse V CHS CsmA aus *A. nidulans* durch Mikrotubuli und assoziierte Motoren diskutiert (Takeshita et al, 2005) - endgültige experimentelle Beweise fehlen jedoch. Im Gegensatz dazu unterstützt die ungewöhnliche Domänenstruktur der Klasse XVII Myosine die Annahme, dass die eigene Myosin-Motordomäne das Enzym zur apikalen Wachstumszone transportiert (Abramczyk et al, 2009; Choquer et al, 2004; Fujiwara et al, 1997). Tatsächlich spielt das Aktin-Cytoskelett für die polare Lokalisierung von Chs3p aus *S. cerevisiae* und WdChs5p in *W. dermatitidis* eine entscheidende Rolle (Abramczyk et al, 2009; Santos & Snyder, 1997). Aktin Pull-down Analysen und mikroskopische Untersuchungen konnten des Weiteren bestätigen, dass die Myosin-Motordomäne von CsmA an F-Aktin bindet (Takeshita et al, 2005) und die Aktinbindung für die korrekte Lokalisierung an der Hyphenspitze und für das Hyphenwachstum essentiell ist (Takeshita et al, 2005). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese eines möglichen Transports durch die eigene Motordomäne. Um zunächst herauszufinden, welche Cytoskelett-Komponenten für die

apikale Mcs1-Akkumulation in *U. maydis* verantwortlich sind, wurden Inhibitorstudien durchgeführt. Es war jedoch denkbar, dass durch die Hemmung des Aktin-Cytoskeletts durch Zugabe von Latrunculin A eine Beeinträchtigung der Endozytose erfolgen könnte, was unerwünschte pleiotrophe Effekte nach sich ziehen würde. In *S. cerevisiae*, aber auch in *U. maydis*, sind endozytotische Prozesse Aktin-abhängig (Ayscough et al, 1997; Fuchs et al, 2006; Geli & Riezman, 1998; Pruyne & Bretscher, 2000) und die Endozytose einiger CHS konnte bereits in *S. cerevisiae* demonstriert werden (Chuang & Schekman, 1996; Ziman et al, 1996). Demzufolge wurden die Inhibitorversuche unter Bedingungen durchgeführt, bei der die *mcs1*-Expression durch einen induzierbaren Promotor kontrolliert wurde. Dabei erfolgte die Zugabe des Hemmstoffs zwei Stunden nach der Geninduktion und die polare Lokalisation wurde nach vier Stunden visualisiert. Nach Zerstörung des Mikrotubuli-Cytoskeletts durch Verwendung von Benomyl wurde die Mcs1-Akkumulation an der Wachstumsspitze im Vergleich zur Kontrolle nicht gestört. Daraus lässt sich schließen, dass Mikrotubuli in haploiden Sporidien keinen Einfluss auf die Mcs1-Polarisierung ausüben. Im Gegensatz dazu wurde jedoch in späteren Motilitätsanalysen eine deutliche Reduktion der Bewegungsfrequenz nach Benomylzugabe beobachtet (vgl. Abb. 27). Dieser Widerspruch ist zum derzeitigen Zeitpunkt nicht erklärbar.

Der Verlust der polaren Mcs1-Lokalisation durch die Hemmung des Acto-Myosin-Systems nach Zugabe von LatA oder BDM weist jedoch deutlich auf eine Rolle des Aktin-Cytoskeletts und von Myosin-Motoren für die Polarität Mcs1-gebundener Chitosomen hin. Die Zugabe des Aktin-Inhibitors führte indessen, neben der Reduktion der Signalstärke in der Wachstumszone, auch zu einer gleichmäßigen Verteilung des GFP-Signals in der gesamten Plasmamembran. Dies bedeutet, dass trotz Störungen der Aktin-abhängigen Anlieferung Mcs1-Fusionsproteine in die Plasmamembran gelangen. Dies könnte beispielsweise durch Diffusionsprozesse erfolgen, denn in weiteren Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass nach gleichzeitiger Zerstörung von Aktin und Mikrotubuli und somit der Unterbindung jeglicher Mcs1-Anlieferung, das GFP-Signal ebenfalls gleichmäßig in der gesamten Plasmamembran verteilt war. Obwohl aus diesen Experimenten deutlich wird, dass Aktin und Myosine für die polare Lokalisation von Mcs1 essentiell sind, bleibt dennoch ungeklärt, ob die eigene MMD bei der Anlieferung eine Rolle spielt.

3.4 Die Mcs1 Myosin-Motordomäne weist strukturelle Ähnlichkeiten zu Myosinen auf

Es konnte gezeigt werden, dass das Aktin-Cytoskelett für die polare Lokalisation von Mcs1 essentiell ist. Um theoretisch zu klären, ob sich Mcs1 Myosin-Motordomäne (MMD) wie ein

motiles Myosin verhalten und somit für die Anlieferung von Mcs1 eine Rolle spielen könnte, wurden Sequenzanalysen durchgeführt und ein Strukturmodell der globulären Mcs1 MMD erstellt. Die Mcs1 MMD weist große Sequenzunterschiede zu anderen motilen Myosinen auf (vgl. 2.2) und es wurden besonders zwei spezifische Regionen, in denen Mutationen ansonsten konservierter Aminosäurereste akkumulieren, identifiziert: der P-loop und die Switch II-Region (vgl. 2.2 und Abb. 8). Der P-loop spielt eine entscheidende Rolle in der ADP- und ATP-Bindung (Coureux et al, 2004; Sasaki & Sutoh, 1998; Yount et al, 1995). Mutationen in dieser Region könnten die Affinität für diese Nukleotide verringern. Da sich die Aminosäureaustausche jedoch nicht direkt in der bekannten Konsensus-Sequenz von Myosinen befinden, kann man schließen, dass die Funktion des loops wahrscheinlich erhalten bleibt. Die Switch II-Region ist nur teilweise in die ATP-Bindung involviert und spielt stattdessen auch eine Rolle bei der Signalübertragung des Nukleotid-Bindungszustandes auf den Rest des Moleküls. Die mutierten Reste befinden sich am distalen Ende der ATP-Bindestelle und beeinflussen somit mit hoher Wahrscheinlichkeit die letztere Funktion (Sasaki et al, 1998; Sasaki & Sutoh, 1998). Durch Alanin-Scanning Analysen an Myosin II aus *D. discoideum* konnten die Funktionen der einzelnen Aminosäuren innerhalb der Switch II-Region aufgeklärt werden. So zeigte sich, dass der erste Aminosäureaustausch von Isoleucin (*Dictyostelium*) zu Leucin (Mcs1) wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Motorfunktion hat. Jedoch könnte eine Mutation von der sauren Aminosäure Glutamat in *Dictyostelium* zur polaren/neutralen Aminosäure Glutamin in *U. maydis* Mcs1 Auswirkungen auf die Funktion haben (vgl. Abb.8). Der Austausch von Glutaminsäure zu Alanin führte in *Dictyostelium* durch die Verminderung der basalen ATPase-Aktivität zum Verlust der Motorfunktion.

Trotz auffälliger Sequenzunterschiede zeigte die bioinformatisch durch Modellierungen ermittelte 3-D-Struktur der Mcs1 MMD, dass die Sekundär- und Tertiärstruktur sowie die bekannten Motive und Domänen anderer funktioneller Myosine auch in Mcs1 konserviert sind (vgl. 2.2). In den Bereichen der Aktin-Bindungsstellen wurden jedoch deutliche Unterschiede des Mcs1-Motorkopfes im Vergleich zu anderen Myosinen sichtbar. Die Aktin-Bindungsregion innerhalb der MMD von Myosinen besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Strukturen und „loops“ (Milligan, 1996), dazu gehören in Myosin IE aus *D. discoideum* ein Helix-loop-Helix Motif, der loop-2, der CM-loop („Cardiomyopathy loop“ oder „myopathy loop“), loop-3 und loop-4 (Kollmar et al, 2002). Der CM-loop spielt für die Myosin-Aktivität eine wichtige Rolle. Eine Punktmutation in diesem Bereich der MMD des humanen Herzmuskel-Myosins führt zu einer genetisch bedingten Erkrankung des

Herzmuskels (hypertrophic cardiomyopathy) (Geisterfer-Lowrance et al, 1990). Punktmutationen innerhalb des „myopathy loops“ und dessen gesamte Deletion führten in *A. nidulans* und *D. discoideum* zu einer verringerten Affinität für F-Aktin bzw. zum kompletten Verlust der Aktinbindung (Sasaki et al, 1999; Takeshita et al, 2005). Innerhalb des CM-loops befindet sich zudem ein regulatorisches Zentrum, die so genannte „TEDS-site“ (Bement & Mooseker, 1995). Die meisten Myosine, wie auch Mcs1 von *U. maydis*, besitzen an dieser Stelle einen Glutamat- bzw. Aspartatrest, der zu einem konstitutiv aktivierten Myosin führt. Im Gegensatz dazu enthalten einige Myosine, wie *Acanthamoeba castellanii* Myosin 1C, an dieser Stelle einen Serin- oder Threoninrest, der durch spezifische Kinasen phosphoryliert und dadurch die Myosin-Aktivität reguliert wird (Brzeska & Korn, 1996; Wang et al, 1998). Der „myopathy loop“ spielt auch für die Mcs1 Funktion eine entscheidende Rolle. Die Deletion dieses Aktin-Bindungsloops in der Mcs1 MMD führte, wie auch für CsmA aus *A. nidulans* (Takeshita et al, 2005) beschrieben, zur Fehllokalisation des GFP-Fusionsproteins sowie einem signifikanten Pathogenitätsverlust (vgl. 2.3 und 2.7.1). Diese Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass die Aktinbindung für die Funktion der Mcs1-Myosin-Motordomäne entscheidend ist. Die Bedeutung des Glutamat-Restes an der TEDS-site für die Funktion des Myosins gilt es in späteren Folgeexperimenten zu untersuchen.

Interessanterweise wurden aus den Strukturmodellen lange Insertionen und Sequenzeinschübe ersichtlich. Die betroffenen Bereiche bilden in aktiven Myosinen höchstwahrscheinlich einen Teil der Aktin-Bindestelle. Goodson et al. (1999) konnten durch Strukturanalysen und –vergleiche schwach konservierter Regionen verschiedener Myosine feststellen, dass diese Insertionen die kinetischen Enzym-Eigenschaften bestimmen (Goodson et al, 1999). Das Vorhandensein dieser ausgedehnten „loops“ deutet daher auf eine funktionelle Rolle hin. Sequenzeinschübe ähnlicher Länge konnten beispielsweise auch in Klasse IX Myosinen identifiziert werden. Humanes Myo9b ist ein monomeres Myosin, dass über lange Distanzen prozessiv an Aktin Filamenten entlang „laufen“ kann (Inoue et al, 2002; Post et al, 2002). Untersuchungen an Myo9b zeigten, dass die Deletion des so genannten „loop 2“ zu einer stark reduzierten Affinität für Aktin und einer erhöhten Nukleotidbindungsrate führen (Nalavadi et al, 2005). Analysen an gereinigtem „loop 2“-Oligopeptiden zeigten, dass diese verlängerte Insertion in Myo9b an F-Aktin bindet und die Aktin-Bindungseigenschaften stark beeinflusst (Struchholz et al, 2009). Sequenzvergleiche des Mcs1-„loops“ zeigten jedoch kaum Ähnlichkeiten zu anderen Myosine. Hohe Sequenzidentitäten über den gesamten Bereich des „loops“ konnten lediglich innerhalb der Klasse V Chitinsynthasen, insbesondere in Basidiomyceten, ermittelt werden, was auf Myosin XVII-spezifische Funktionen hindeuten

könnte (vgl. 2.2). Die Deletion des zu Myo9b analogen Bereiches in der Mcs1-Motordomäne konnten den *mcs1*-Deletionsphänotyp bezüglich des Pathogenitätsdefekts und der morphologischen Eigenschaften nicht komplementieren. Dies könnte ein Hinweis auf zusätzliche regulatorische Aufgaben dieser Sequenzeinschübe darstellen. Ob es sich bei diesen Funktionen um den Einfluss auf die Aktin-Bindungseigenschaften handelt bleibt mittels Aktin-Bindungsassays zu untersuchen.

Neben der konservierten MMD spielen auch die Halsregion und die Dimerisierung von Myosinen für die Ausübung von Bewegungen eine bedeutende Rolle. In der „neck“-Region konventioneller und unkonventioneller Myosine befinden sich so genannte IQ-Motive. Diese Regionen dienen im Allgemeinen als „lever“-Arme für die schrittweise Bewegung entlang von Aktin-Filamenten (Kohler et al, 2003; Purcell et al, 2002; Uyeda et al, 1996). Für die Motilität einiger Myosine kommen auch Coiled Coil Regionen eine bedeutende Funktion zu, indem sie die Bildung von Dimeren unterstützen, und wie für MyoV beschrieben, als zweiköpfige Myosine in einem „hand-over-hand“ Mechanismus entlang von Aktin-Filamenten laufen können (Mermall et al, 1998).

Wie und welche Faktoren für Bewegung, Schrittweite und Prozessivität jedoch essentiell sind wird in der Literatur vielfach kontrovers diskutiert. Beispielsweise konnten Purcell et al. (2002) in Untersuchungen an Myosin V zeigen, dass die Länge des „lever“-Arm proportional zur Ruderschlagweite des Motorkopfes ist und die Reduktion der Halsregion zu verkürzten Schlaglängen bis hin zum vollständigen Verlust der Prozessivität führt. Neuere Untersuchungen an Myosin VI stellen jedoch die „lever“-Arm Theorie in Frage (Spudich & Sivaramakrishnan, 2010). Obwohl MyoVI nur einen kurzen „lever“-Arm besitzt, kann mit Hilfe einer globulären proximalen Schwanzregion und einer starren α -Helix ein großer Ruderschlag von ~30 nm erzielt werden (Spudich & Sivaramakrishnan, 2010). Auch die Frage, ob schnelle Bewegungen die Ausbildung von Dimeren erfordern, wird in einigen Publikationen widersprüchlich diskutiert. Grallert et al. (2007) ermittelten, dass für die *in vivo* Motilität von Myo52, einem Klasse V Myosin aus *S. pombe*, die Ausbildung von Dimeren essentiell, jedoch unabhängig von der „neck“-Region ist (Grallert et al, 2007). Dagegen zeigten Watanabe et al. (2004), dass künstlich erzeugte, monomere Myosin-V Motorköpfe mehrere große Schritte entlang von F-Aktin ausüben können. Auch einzelköpfige Myosine, wie die Klasse I Myosine und Myosin IXb können sich in einigen Fällen schnell und prozessiv bewegen (Dürrwang et al, 2006; Post et al, 2002), für andere zweiköpfige Myosine

hingegen, wie den Klasse V Myosine Myo2p und Myo4p aus Hefe wurde gezeigt, dass es sich um nicht-prozessive Aktin-abhängige Motoren handelt (Reck-Peterson et al, 2001).

Die Rolle des „lever“-Arms und die Funktion der Dimerisierung in Bezug auf Bewegung, Schrittweite und Prozessivität sind in den untersuchten Myosinen umstritten und können daher nicht für alle Myosine verallgemeinert werden. Betrachtet man jedoch die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse im Ganzen, spricht vieles für Mcs1 als funktionellen Myosinmotor. Auch in der Mcs1 MMD befindet sich ein für Myosine typisches IQ-Motiv. Des Weiteren konnte C-terminal der Mcs1 MMD eine Coiled Coil Regionen identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass die Mcs1-MMD an Aktin bindet (vgl. 2.12.3) und in der Lage ist Dimere auszubilden (vgl. 2.12.2). Ein Hinweis, dass es sich dennoch um einen nicht-prozessiven Motor handeln könnte, lässt sich von den Ergebnissen der Aktin Co-Sedimentation ableiten. In diesen konnte gezeigt werden, dass die Mcs1 MMD in Anwesenheit von ATP die Affinität zu Aktin verliert. Dieses Verhalten wurde auch für andere nicht-prozessive Motoren, wie Myo2p aus *S. cerevisiae*, nachgewiesen (Reck-Peterson et al., 2001). Im Gegensatz zu prozessiven Motoren wie M5a aus *G. gallus*, besitzt Myo2p in Gegenwart von ATP ebenfalls eine geringe Affinität zu Aktin (Mehta et al, 1999; Reck-Peterson et al, 2001).

3.5 Die MMD ist für die polare Lokalisierung von Mcs1 essentiell

Um zu klären, ob die eigene Myosin-Motordomäne (MMD) für die polare Lokalisierung von Mcs1 verantwortlich ist wurde der Einfluss verschiedener Punktmutationen und Deletionen in der Mcs1-Myosinmotor- und Chitinsynthase-Domäne auf die apikale Mcs1-Akkumulation untersucht.

Da die Myo5-Motordomäne von *U. maydis* in der Lage ist, auch ohne die „tail“-Region an der Spitze zu lokalisieren (nicht gezeigt), wurde zunächst getestet, ob die polare Mcs1-Akkumulation ohne die Chitinsynthase-Domäne erfolgen kann. Die Expression der Motordomäne inklusive Linkerregion (G₃Mcs1H) führte jedoch lediglich zu einem cytoplasmatischen Signal. Daraus lässt sich schließen, dass die Chitinsynthase-Domäne und somit die Integration in Membranen für die Lokalisation in Chitosomen essentiell ist. Das mutierte Fusionsprotein G₃Mcs1^{CHSdead} dagegen lokalisierte an der apikalen Wachstumszone und bildet dort einen Gradienten in der Plasmamembran aus (vgl. Abb. 21). Dies deutet darauf hin, dass weder der Anlieferungsmechanismus noch die Fokussierung an der Spitze durch das Einfügen der Punktmutationen in der Chitinsynthase-Domäne und damit durch die fehlende CHS-Aktivität beeinträchtigt sind. Die Rolle der MMD für die polare Lokalisation von

A. nidulans wurde bereits anhand der Klasse V CHS CsmA geklärt. Dort konnte gezeigt werden, dass die Deletion der gesamten MMD, aber auch die Zerstörung einer Aktin-Bindungsschleife, für die apikale Akkumulation verantwortlich sind, jedoch die ATPase Aktivität, die durch eine Punktmutation in P-loop analysiert wurde, keine Rolle spielt (Takeshita et al, 2005). Analog zu diesen Versuchen wurde die Funktion der MMD in *U. maydis* Mcs1 zunächst durch Deletion der kompletten für den Myosin-Motorkopf kodierenden Region analysiert. Im Einverständnis mit der Hypothese, dass die MMD für die Lokalisation eine bedeutende Rolle spielt, konnte keine Akkumulation des Fusionsproteins an der Wachstumszone beobachtet werden. Im Gegensatz zu der Arbeit an CsmA wurden jedoch gelegentlich einige wenige Signale in der Plasmamembran visualisiert. Diese Versuche bestätigen also, dass die Mcs1 MMD, wie für das *A. nidulans* Ortholog beschrieben, für die Lokalisation des Proteins eine Rolle spielt. Es scheinen jedoch trotzdem noch einige Chitosomen mit der Plasmamembran zu verschmelzen. Auch die Deletion einer Aktin-Bindungsschleife, des so genannten „myopathy loops“, von dem bereits der Einfluss auf die Aktinbindung und Funktion in der Lokalisation gezeigt werden konnte (Sasaki et al, 1999; Takeshita et al, 2005), zeigte einen ähnlichen Phänotyp wie in CsmA, und unterstützt somit die Hypothese, dass Klasse V CHS mit Hilfe ihrer eigenen funktionellen MMD zur Wachstumszone transportiert werden. Die Verwendung mutierter Allele in *csmA*, die für einen Aminosäureaustausch im P-loop kodieren, deutet jedoch darauf hin, dass die ATPase-Aktivität keine Rolle für die Lokalisierung von Klasse V CHS spielt. Dies widerspricht den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen. *U. maydis* Mcs1 Mutanten, die eine Punktmutation tragen (E407K), von der bereits in MyoA aus *A. nidulans* sowie MyoII aus *D. discoideum* eine Reduktion der ATPase-Aktivität und der Verlust der Aktinbindung in Anwesenheit von ATP ermittelt werden konnten (Abb. 35; (Liu et al, 2001; Ruppel & Spudich, 1996), lokalisieren nicht am Apex. Eine Erklärung für diese Unterschiede erfordert einen näheren Einblick in den Querbrückenzyklus von Myosinen und die detaillierte Analyse beider Mutationen (Abb. 35).

Die von Takeshita et al. (2005) eingeführten Aminosäureaustausche in der ATP-Bindungstasche führen zu einer Blockierung der ATP-Bindung (Sasaki & Sutoh, 1998), die das Ablösen des Myosinkopfes vom Aktin-Filament verhindert (Abb. 35; (Ruppel & Spudich, 1996). Myosin-Motordomänen, die spezifische Mutationen im P-loop oder der Switch I Region aufweisen, sollten folglich an Stellen, an denen sie mit F-Aktin interagieren, fest an das Filament binden und in einem so genannten „Rigor“ Zustand resultieren (Abb. 35).

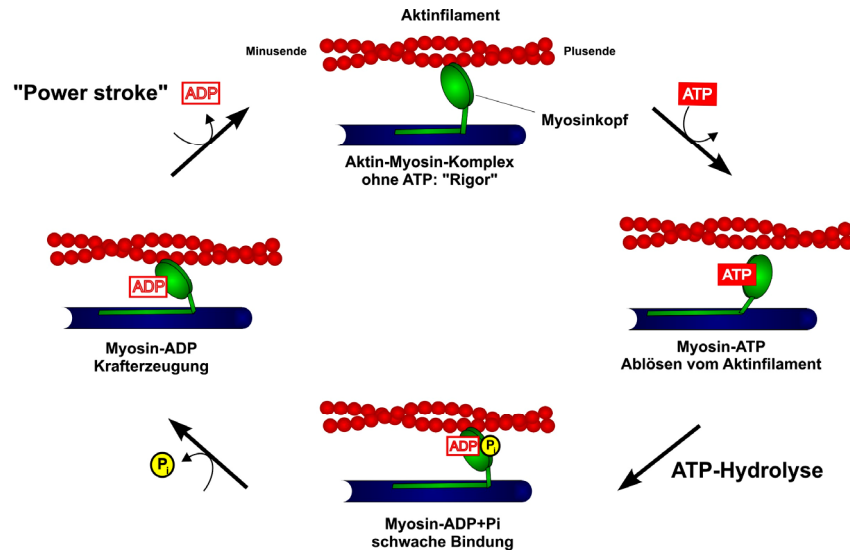


Abb. 35. Querbrückenzyklus von Myosinen. Zu Beginn des Querbrückenzyklus ist der Myosin-Motorkopf durch das Fehlen eines Nukleotids im aktiven Zentrum fest, in der so genannten „Rigor“-Konfiguration, mit dem Aktin-Filament verbunden. Durch Bindung von ATP kommt es zu einer Konformationsänderung in der Aktin-Bindungsregion und zum Ablösen des Myosinkopfes. Die ATP-Hydrolyse bewirkt eine schwache Bindung und eine Verschiebung entlang des Aktin-Filaments (~5nm). Das Ablösen von zunächst P_i und anschließend ADP führt zu einer starken Aktinbindung und durch Kraftentwicklung zur Ausübung des Ruderschlages. Während der Krafterzeugung löst sich ADP und der Motorkopf nimmt seine Ausgangsposition ein, einen neuen Querbrückenzyklus auszuüben. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Alberts et al, 2002) erstellt.

Durch Einführen einer zu Takeshita et al. (2005) analogen Mutation im P-loop (G113E) in der Mcs1 MMD konnte diese Vermutungen bestätigt werden. G_3Mcs1^{Rigor} -Mutanten lokalisierten in der Tat an der Wachstumsspitze haploider *U. maydis* Sporidien, was durch den fest gebundenen Zustand erklärt werden kann. Ob durch die eingefügte Mutation die Integration der Chitosomen in die Plasmamembran weiterhin erfolgen kann, bleibt in späteren Experimenten zu klären. Dass sich die Lokalisierung der „Rigor“-Mutante von der des Mcs1 Wildtypproteins unterscheidet, ist sehr wahrscheinlich und könnte durch so genannte „linescan“-Analysen ermittelt werden.

Da die Klasse V CHS Mcs1 für eine erfolgreiche Besiedelung der Pflanze essentiell ist und die Proliferation im Blattgewebe ausschließlich durch filamentöses Wachstum erfolgen kann, wurde die Lokalisierung der verschiedenen Mcs1-Mutanten in intrazellulär wachsenden Hyphen in infiziertem Maisgewebe analysiert. Da das infizierte Blattgewebe nach *U. maydis* Infektionen mit den unterschiedlichen Mutationsstämmen im Deletionshintergrund einen starken Fluoreszenzhintergrund aufwies, wurden die mutierten G_3Mcs1 -Konstrukte als zusätzliche Kopie in SG200-Derivaten exprimiert. In diesen Versuchen konnten die in den haploiden Sporidien ermittelten Lokalisationen der unterschiedlichen Proteinversionen bestätigt werden. Interessanterweise konnte zudem in den SG200 G_3Mcs1 -Stämmen eine Anhäufung des GFP-Signals an intrazellulären Zell-Zell-Passagen, wo Pilzhypen von einer Pflanzenzelle in die benachbarte Zelle penetrieren, beobachtet werden (vgl. Abb. 23). Diese

Penetration erfolgt mit Hilfe einer Appressorien-ähnlichen Struktur (Doehlemann et al, 2008b), an dessen apikalen Bereich sich das Fusionsprotein vermehrt sammelte. Dies könnte auf einen zusätzlichen Hinweis einer Rolle von Mcs1 für die Ausbildung funktioneller Appressorien hinweisen (vgl. 3.2).

3.6 Mcs1-gebundene Chitosomen werden nicht durch die eigene Motordomäne transportiert

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die polare Mcs1-Lokalisation ein intaktes Aktin-Cytoskelett und die eigene Myosin-Motordomäne erfordert. Des Weiteren bestätigten *in silico* Analysen, dass die Motordomäne theoretisch als motiler Motor funktionieren könnte. Wenn jedoch Mcs1 seine eigene Chitinsynthase-Domäne zum Zellapex anliefern würde, müsste die Motordomäne funktionell ebenso wichtig wie die Chitinsynthase-Domäne sein. Die ermittelten funktionellen Daten konnten dies jedoch nicht bestätigen. Um dieses Paradox zu untersuchen wurde die Bewegung individueller Chitosomen in haploiden Sporidien visualisiert. Es konnte ermittelt werden, dass sich G₃Mcs1-Signale bi-direktional mit einer mittleren Geschwindigkeit von ca. 1.5 µm/s bewegen. Überraschenderweise bewegten sich G₃Mcs1^{ΔMM}-bindende Chitosomen ebenfalls bi-direktional und in Bezug auf die Geschwindigkeit und der Frequenz der Bewegungen ohne signifikante Unterschiede zur Kontrolle (vgl. 2.9). Inhibitorversuche verdeutlichten, dass die Motilität dabei abhängig vom Aktin-Cytoskelett und Myosinen war, jedoch konnte auch nach Zugabe des Mikrotubuli-Inhibitors Benomyl eine signifikante Abnahme der anterograden Bewegung beobachtet werden. Diese Versuche beweisen, dass die Anlieferung Mcs1-bindender Chitosomen in *U. maydis* nicht, wie in der Literatur vielfach diskutiert, durch die eigene Motordomäne erfolgt. Stattdessen spielen Mcs1-unabhängige Transportprozesse eine Rolle. Die Inhibitorstudien weisen dabei darauf hin, dass sowohl das Aktin-Cytoskelett und assoziierte Myosine als auch das Mikrotubuli-Cytoskelett beim Transport eine Rolle spielen. Daher ist anzunehmen, dass F-Aktin und Mikrotubuli im Mcs1-Chitosomen Transport in haploiden *U. maydis* Sporidien zusammenarbeiten. Vorstellbar wäre, dass anstelle der eigenen Motordomäne ein anderer molekularer Motor, wie beispielsweise Aktin-abhängige Myosine, den Transport von Mcs1 zum Apex übernimmt.

Die Rolle Myosin-abhängiger Transportprozesse für die Mcs1-Bewegung in haploiden *U. maydis* Sporidien wurde daher in dieser Arbeit näher untersucht. Sporidien und Hyphen von *U. maydis* weisen ein ausgeprägtes Aktin-Cytoskelett mit langen Aktin-Filamenten auf (Banuett & Herskowitz, 2002) und Aktin-abhängige Transportprozesse scheinen für das

Spitzenwachstum von Hyphen entscheidend zu sein (Schuchardt et al, 2005; Weber et al, 2003). Das Genom von *U. maydis* kodiert, neben *mcs1*, noch für drei weitere Myosine, die zu den Klassen I, II und V gehören. In anderen Zellsystemen wurde für alle Klassen eine Rolle in der Sekretion beschrieben (Loubery & Coudrier, 2008). In den Modellorganismen *S. cerevisiae* und *S. pombe* wurde bereits die Rolle von Klasse V Myosinen für die Anlieferung sekretorischer Vesikeln zur Wachstumsregion experimentell bestätigt (Govindan et al, 1995; Johnston et al, 1991; Motegi et al, 2001; Mulvihill et al, 2006; Schott et al, 2002; Win et al, 2001). Auch in *C. albicans* wurde gezeigt, dass das polare Wachstum von MYO2, einem Klasse V Myosin, abhängig ist (Woo et al, 2003). Des Weiteren konnte für die Chitinsynthase Chs3p aus *S. cerevisiae* eine Beteiligung des Klasse V Myosins Myo2p an deren Lokalisation gezeigt werden (Santos & Snyder, 1997). Diese Arbeiten weisen auf eine Rolle von Myo5 als Aktin-abhängiger Motor in Langstreckentransporten hin. Jedoch auch für die Klasse I und II Myosine sind Funktionen im Membran- und Vesikeltransport ermittelt worden. Klasse I Myosine sind für den endozytotischen und exozytotischen Membrantransport (Neuhaus & Soldati, 2000; Yamashita & May, 1998) sowie für die Zellbewegung, die Zellentwicklung und das Zellwachstum in verschiedenen Organismen von Bedeutung (Coluccio, 1997; Mermall et al, 1998). In den filamentösen Pilzen *A. nidulans* und *C. albicans* wurde die essentielle Rolle von Klasse I Myosinen für die Sekretion und das polare Wachstum experimentell nachgewiesen (McGoldrick et al, 1995; Oberholzer et al, 2004; Oberholzer et al, 2002; Osherov et al, 1998). Dabei könnten Klasse I Myosine direkt mit sekretorischen und endozytotischen Vesikeln assoziiert sein und diese entlang von Aktin-Filamenten bewegen oder sie sind an der Organisation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt und somit indirekt für den Aktin-abhängigen Vesikeltransport verantwortlich (Tuxworth & Titus, 2000). Neben der Rolle bei der Cytokinese (Mulvihill & Hyams, 2003) wurde für Klasse II Myosine auch die Assoziation mit Golgi-Membranen belegt, was auf eine Funktion im Golgi-Transport hindeutet (Ikonen et al, 1997). Für das Klasse II Myosin Myo1p aus *S. cerevisiae* wird ebenfalls der Transport der Chitinsynthase Chs2p diskutiert (Brown, 1997). Daher ist es möglich, dass auch diese Myosine an der Mcs1-Anlieferung in *U. maydis* Sporidien beteiligt sind.

Die Rolle der Klasse I und II Myosine ist in *U. maydis* noch nicht bekannt. *U. maydis* Δ myo5-Hyphen zeigen hingegen ein irreguläres, spiralförmiges Wachstumsverhalten und weisen eine unregelmäßige Chitin-Verteilung entlang der gesamten Hyphe auf (Weber et al, 2003), was auf eine Rolle von Myo5 für die Mcs1-Verteilung hindeuten könnte. Basierend auf den oben beschriebenen Erkenntnissen aus anderen Organismen war jedoch auch der Transport von

Chitosomen durch Klasse I und II Myosine denkbar. Daher wurden alle drei *U. maydis*-Myosine bezüglich der Mcs1-Anlieferung untersucht. Leider konnten im Rahmen dieser Arbeit keine *myo1*- und *myo2*-Deletionsmutanten bestätigt werden (vgl. 2.10). Da jedoch schon für anderen Myosine gezeigt wurde, dass Deletionsmutanten einen starken Wachstumsphänotyp zeigten bzw. die Mutationen letal waren (Goodson et al, 1996; McGoldrick et al, 1995), ist diese Möglichkeit auch hier sehr wahrscheinlich. Als Alternative zu Deletionsmutanten konnte die Funktion von Myosinen in verschiedenen Zellsystemen durch die Expression dominant-negativer Domänen ermittelt werden (Rudolf et al, 2003; Varadi et al, 2005). Dabei wurde die Eigenschaft genutzt, dass diese Protein-Fragmente mit dem endogenen Myosin konkurrieren und die endogene Myosin-Funktion dadurch gehemmt wird. Wie erwartet rief die induzierte Expression der dominant-negativen „Rigor“ und „tail“-Allele starke morphologische Anomalien hervor, wobei der induzierte Phänotyp im Falle von Myosin5 dem publizierten Myo5-Deletionsphänotyp stark ähnelte (vgl. 2.10; (Weber et al, 2003). Die Expression der „Rigor“-Allele zeigte, dass sowohl Myo1 als auch Myo5 einen Einfluss auf die Mcs1G₃-Lokalisation an der apikalen Plasmamembran haben, was auf eine Rolle beider Myosine für die Polarisierung von Mcs1 hindeutet. Nach Induktion der „tail“-Allele konnte jedoch nur noch die Rolle von Myo5 für die Polarität von Mcs1 in haploiden *U. maydis* Sporidien verifiziert werden (vgl. 2.10). Das Klasse II Myosin Myo2 in *U. maydis* scheint für die Mcs1-Anlieferung keine Rolle zu spielen; für Myosin 1 hingegen konnte zumindest in einem Teilexperiment, durch Expression des „Rigor“-Konstruktes, ebenfalls ein Einfluss auf die polare Mcs1-Lokalisation beobachtet werden (vgl. 2.10). Da die Punktmutation lediglich in Analogie zu der in Takeshita et al. (2005) beschriebenen Mutation in CsmA aus *A. nidulans* generiert würde, müsste die Funktionalität der „Rigor“-Mutation biochemisch in einem Aktin-Co-Sedimentations Assay bestätigt werden, um eine endgültige Aussage treffen zu können. Neben Myo5 kann eine Rolle von Myo1 für die apikale Lokalisation daher nicht vollständig ausgeschlossen werden. So werden in mehreren Publikationen indirekte Anzeichen für einen Zusammenhang von Klasse I Myosinen und dem Zellwandaufbau bzw. Zellwandbestandteilen diskutiert. Beispielsweise zeigen Mutanten der Klasse I Myosine in *S. cerevisiae* und *C. albicans* Störungen in der Chitin- und Zellwandablagerung (Goodson et al, 1996; Oberholzer et al, 2002). Die beschriebenen Einflüsse von Klasse I Myosinen auf die Zellwandzusammensetzung können jedoch auch sekundäre Effekte darstellen, denn nach deren Deletion konnte auch der Verlust der Aktin-Organisation nachgewiesen werden (Goodson et al, 1996), der die polare Fokussierung von CHS indirekt beeinflussen könnte.

Die ermittelten Ergebnisse konnten einen Einfluss von Myosin 5 und dem Aktin-Cytoskelett auf die Mcs1-Lokalisierung deutlich machen. Jedoch wies auch die Zerstörung des Mikrotubuli-Cytoskeletts einen signifikanten Einfluss auf die Mcs1-Motilität auf (vgl. 2.9). Dass Mikrotubuli im Klasse V CHS Transport eine Rolle spielen, wurde bereits von Takeshita et al. (2005) diskutiert. Dafür spricht ebenso, dass weitläufig die Meinung vertreten wird, dass Langstreckentransporte von Transportvesikeln durch Mikrotubuli und assoziierte Kinesine vermittelt werden (Brand & Gow, 2009; Steinberg, 2007a; Steinberg, 2007b). In pilzlichen Hyphen sind die Plus-Enden von Mikrotubuli zur Wachstumsspitze gerichtet (Konzack et al, 2005; Schuchardt et al, 2005). Diese Beobachtung deutet ebenfalls auf eine Rolle von Kinesinen hin. Das Genom von *U. maydis* kodiert für zehn Kinesine (Schuchardt et al., 2005). Ihre Rolle im Langstreckentransport von Chitosomen und die Zusammenarbeit mit Aktin-abhängigen Motoren ist ein interessanter Aspekt, der in näherer Zukunft getestet werden sollte.

3.7 Was ist die Funktion von Mcs1 an der apikalen Wachstumszone?

Im allgemeinen glaubt man, dass unkonventionelle Myosine Transporter darstellen, die ihr jeweiliges „cargo“ von Mikrotubuli-abhängigen Motoren erhalten, um es dann über kurze Strecken zu transportieren (Langford, 1995). Jedoch zeigen neuste Veröffentlichungen, dass Myosine zusätzlich eher lokale Funktionen, wie die Organisation des Aktin-Cytoskeletts, die Vesikelanbindung und Funktionen während der Transkription, ausüben (zusammengefasst in (Woolner & Bement, 2009)). Tatsächlich sind Beweise, dass sich unkonventionelle Myosine als Transporter verhalten auf wenige Beispiele begrenzt (Woolner & Bement, 2009). Dazu gehören Klasse XI Myosine aus Algen und Pflanzen (Holweg & Nick, 2004), Klasse VI Myosine aus Säugerzellen (Aschenbrenner et al, 2004) und Klasse V Myosine in Hefen und Säugetieren (Govindan et al, 1995; Mehta et al, 1999; Mulvihill et al, 2006; Schott et al, 2002). Im Besonderen stellen neuere Erkenntnisse über Myo5 in Säugetierzellen die vermutete Rolle in der Vermittlung von Transportprozessen Membran-umschlossener Vesikel in Frage. In *Xenopus*-Zellen lokalisiert Myosin-V in sich schnell bewegenden Melanosomen (Rogers & Gelfand, 1998). Anstatt jedoch Organellen über längere Distanzen zu transportieren, scheint Myosin-V Organellen am Zellcortex zu verankern (Wu et al, 1998b). Dabei verhindert die Myosin-Va abhängige Interaktion von Melanosomen mit F-Aktin, dass diese Organellen über Mikrotubuli wieder zurück zur Zellmitte abtransportiert werden (Wu et al, 1998b). Ein weiteres Beispiel für die Rolle unkonventioneller Myosine in exozytotischen Prozessen kommt aus Untersuchungen an Myosin-5 in humanen neuroendokrinen Zellen

(Desnos et al, 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sekretorische Granula vor der Exozytose mehrere Sekunden an der Plasmamembran verweilen und diese Verweildauer durch das „silencing“ von Myosin-5 signifikant verkürzt werden konnte (Desnos et al, 2007). Dies weist darauf hin, dass Klasse V Myosine unkonventionelle Myosine sind, die das dynamische Anbinden und Andocken von Vesikeln an Orten an denen aktive Sekretion erfolgt, darstellen können.

In dieser Arbeit wurde belegt, dass Mcs1 nicht der Motor ist, der Mcs1-gebundene Chitosomen zur Wachstumszone transportiert. Stattdessen spielen andere molekulare Motoren, darunter Myo5, beim Transport und der Lokalisation eine Rolle. Die MMD ist jedoch wichtig für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* und die polare Lokalisation des Proteins (vgl. 2.3 und 2.7). Daher besteht die Möglichkeit, dass auch die Mcs1 MMD eher lokale Funktionen am Zellapex übernimmt. Untersuchungen zur Verweildauer der Chitosomen an der apikalen Plasmamembran bestätigten, dass diese häufig für einige Sekunden an der Plasmamembran verweilen, bevor sie mit dieser fusionieren (vgl. Abb. 24A, roter Pfeil). Die Deletion der Motordomäne hatte zur Folge, dass G₃Mcs1^{ΔMM}-gebundene Chitosomen über signifikant kürzere Zeiträume an der Plasmamembran verharren als G₃Mcs1-gebundene Chitosomen, bevor sie schließlich zur retrograden Bewegung umkehren. Daraus lässt sich ableiten, dass das Klasse XVII Myosin Mcs1, ähnlich wie das beschriebene Klasse V Myosin in humanen neuroendokrinen Zellen (Desnos et al, 2007), für die Fusion und/oder der Verankerung der Chitinsynthase in der Plasmamembran eine entscheidende Rolle spielen könnte und die MMD auf diese Weise die Sekretion der von Vesikeln an der apikalen Plasmamembran unterstützt.

Eine besondere funktionelle Rolle scheint der Coiled coil Region in Mcs1 zuzukommen. Es konnte belegt werden, dass über diese Domäne die Ausbildung von Dimeren erfolgt. Die Dimerisierung könnte darauf hinweisen, das Mcs1, wie z. B. MyoV, in einem „hand-over-hand“-Mechanismus entlang von Aktin Filamenten „laufen“ kann (Yildiz et al, 2003). Demzufolge würde die Deletion dieser Region die Motorfunktion ausschalten und man würde Auswirkungen auf Morphologie und Virulenz erwarten, die denen anderer Motordomänen-Mutanten ähneln. In allen durchgeführten Versuchen führte jedoch die Deletion der Coiled coil Domäne zu Veränderungen, die den phänotypischen Abweichungen der *mcs1*-Deletionsmutante und dem Chitinsynthase-inaktiven Stamm gleichen (vgl. 2.3). Die Region scheint somit für die Funktionalität der CHS-Domäne essentiell zu sein und könnte für eine besondere Rolle der „neck“-Region sprechen. Beispielsweise könnten andere essentielle

regulatorische Faktoren an die Halsregion von Msc1 binden. Ob diese existieren und wie sie die Myosin XVII Funktion beeinflussen könnten, sollte in späteren Arbeiten analysiert werden. Anhaltspunkte könnten aus Versuchen in Säugetierzellkulturen kommen, in denen bereits gezeigt werden konnte, dass die „neck“-Region von Myosin-5a mit einem Syntaxin-1 interagiert und dadurch die Exozytose an der Plasmamembran reguliert (Watanabe et al, 2005).

3.8 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Anlieferung Msc1-gebundener Chitosomen nicht von der eigenen Motordomäne abhängig ist und stattdessen andere molekulare Motoren in den Transportmechanismus zum Apex involviert sind. Diese Beobachtungen werfen zwei wichtige Fragen auf, die es in Zukunft näher zu analysieren gilt: (1) Welches sind die molekularen Mechanismen, die der Anlieferung von Msc1 zu Grunde liegen und (2) was ist die detaillierte Funktion der Myosin-Motordomäne (MMD) an der polaren Wachstumszone.

Inhibitorversuche konnten verdeutlichen, dass die Motilität Msc1-gebundener Chitosomen abhängig vom Aktin-Cytoskelett und Myosinen ist und es konnte bereits eine Rolle von Myosin 5 in der apikalen Lokalisation bestätigt werden. Jedoch führte auch die Zugabe des Mikrotubuli-Inhibitors Benomyl zu einer signifikanten Abnahme der anterograden Bewegung. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl das Aktin-Cytoskelett und assoziierte Myosine, als auch das Mikrotubuli-Cytoskelett beim Transport eine Rolle spielen und beide Cytoskelett-Komponenten im Msc1-Chitosomen Transport in *U. maydis* zusammenarbeiten. Wie diese Kooperation erfolgt und welche Rolle Mikrotubuli-abhängige Kinesine und Dynein spielen gilt es in Zukunft beispielsweise durch Msc1-Motilitätsanalysen nach der Überexpression dominant-negativer Mutanten verschiedener Motorproteine zu untersuchen.

Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Deletion der Msc1 MMD zur Folge hatte, dass transportierte Chitosomen für kürzere Zeiträume an der Wachstumszone verweilen. Dies spricht für eine Funktion der MMD an der apikalen Plasmamembran, die das Andocken und die Fusion der Vesikel erleichtern könnte. Diese Funktion gilt es in fortführenden Experimenten zu analysieren bzw. ist bereits Thema aktueller Untersuchungen. Zur Klärung der MMD-Funktion könnte beispielsweise die Analyse der Verweildauer von Chitosomen in „Rigor“-Mutanten beitragen. Des Weiteren könnten *in vitro* oder *in vivo* Motilitätsversuche Aufschluss darüber geben, ob Msc1 die Fähigkeit besitzt, entlang von Aktin-Filamenten zu „laufen“, da für viele Myosine gezeigt werden konnte, dass sie in der Lage sind ihr „cargo“ über kurze Strecken zu transportieren.

Auch ein noch besseres Verständnis der Funktion der einzelnen Mcs1-Domänen könnte dazu beitragen, die Rolle der Motordomäne detaillierter verstehen zu können. Dabei gilt es vor allem die Rolle der „neck“-Region und des potentiellen IQ-Motivs zu analysieren. Die Regulation der Motoraktivität könnte, wie für andere Myosine beschrieben, über leichte Ketten erfolgen. Diese potentiellen Interaktionspartner, aber auch andere mit Mcs1 interagierende Proteine, könnten daher mittels Co-Immunopräzipitationen identifiziert werden. Ein weiterer Aspekt im Hinblick auf eine Myosin XVII-spezifische Rolle könnten Untersuchungen des in der Strukturanalyse identifizierten „loops“ geben.

Da man davon ausgeht, dass Mcs1 über mehrere Transmembrandomänen in das Transportvesikel (Chitosomen) integriert ist und für die Fusion dieser Vesikel mit der apikalen Plasmamembran verantwortlich ist, könnte die Lokalisierung unbekannter, für die Virulenz essentieller Faktoren ebenfalls von diesem Mechanismus abhängig sein. Die biochemische Reinigung Mcs1-gebundener Chitosomen und die anschließende massenspektrometrische Bestimmung des transportierten Inhalts könnte ein besseres Verständnis liefern, wie beispielsweise die Ausbildung einer biotrophen Interaktion zwischen *U. maydis* und *Zea mays* gewährleistet wird.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von *p. a.* Qualität und wurden von den Firmen Difco (Augsburg), Fluka (Buchs/Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

4.1.2 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Sambrook (1989) hergestellt (Sambrook, 1989). Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt. Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden, soweit nicht anders beschrieben, vor Verwendung für 5 min bei 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Filteraufsatzes (Porengröße 0,2 µm; Merck) sterilfiltriert.

4.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen. Als DNA-Polymerasen wurden Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) und *PfuUltra*™ High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene) und die Taq DNA-Polymerase (Fermentas) verwendet.

4.1.4 Verwendete Kits und sonstiges Material

In dieser Arbeit wurden folgende Kits verwendet: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und zur Aufreinigung von PCR Produkten und Plasmiden; QIAprep® Spinprep Kit (Qiagen) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA; TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten; DIG High Prime (Roche) zur Dioxigenin-Markierung von PCR-Produkten. Zusätzlich verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

4.2 Zellkultivierung

4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli Stämme wurden in dYT-Medium nach Sambrook (1989) bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Antibiotikazugaben erfolgten nach den in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25% (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

Tabelle 4: Für Bakterienkulturen verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
dYT-Flüssigmedium (Sambrook, 1989)	1,6 % (w/v) Trypton-Pepton 1,0 % (w/v) Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl in dH ₂ O, autoklaviert
YT- Festmedium	0,8 % (w/v) Trypton-Pepton 0,5 % (w/v) Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl 1,3 % (w/v) Agar in dH ₂ O, autoklaviert

4.2.2 Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis Kulturen wurden standardmäßig in Yeps_{light}-Flüssigmedium bei 200 Upm inkubiert. Für Festmedien wurden Potato-Dextrose-Agarplatten, ggf. mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen (Tabelle 5), verwendet. Die dauerhafte Lagerung von *U. maydis* Kulturen erfolgte bei -80°C unter Zugabe von 50% NSY-Glyzerin zu einer dicht gewachsenen Kultur.

Tabelle 5: Für die Kultivierung von *U. maydis* Derivaten eingesetzte Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration
Carboxin (Cbx)	2 µg/ml
Hygromycin (Hyg)	ca. 200 µg/ml
Nourseothricin (Nat)	150 µg/ml
Phleomycin (Phleo)	5 µg/ml
Yeps _{light} (modifiziert nach Tsukuda et al., 1988)	1% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) Pepton 1% (w/v) Saccharose
Potato-Dextrose-Agar (PD)	2,4% (w/v) Potato-Dextrose Broth 2% (w/v) Bactoagar
NSY-Glyzerin	0,8% (w/v) Nutrient Broth 0,1% (w/v) Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) Saccharose 69,6% (v/v) Glyzerin
Filamentationstests wurden auf PD-Aktivkohle-Platten durchgeführt. Für Stressmedien wurden Complete Festmedium-Platten mit Glukose (CM-Glk) die folgenden Stress-induzierenden Substanzen zugefügt: 150 µg/ml Calcofluor White (Fluorescent Brightener 28; Sigma-Aldrich), 1,5 mM H ₂ O ₂ , 45 µg/ml Kongorot (Sigma-Aldrich) sowie 1 M NaCl.	
CM Vollmedium (Holliday, 1974)	0,6% (w/v) NH ₄ NO ₃ 1% (w/v) Casaminosäuren 0,1% (w/v) Heringsperma-DNA 2% (w/v) Hefeextrakt 2% (v/v) Vitaminlösung Nach dem Autoklavieren: 2 % (w/v) Glukose oder Arabinose
Vitaminlösung (Holliday, 1974)	0,1‰ (w/v) Thiamin 0,05‰ (w/v) Riboflavin 0,05‰ (w/v) Pyridoxin 0,2‰ (w/v) Kalziumpantothenat 0,05‰ (w/v) para-Aminobenzoessäure 0,2‰ (w/v) Nikotinsäure 0,2‰ (w/v) Cholinchlorid 1,0‰ (w/v) myo-Inositol sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
Salzlösung (Holliday, 1974)	1,6% (w/v) KH ₂ PO ₄ 0,4% (w/v) Na ₂ SO ₄ 0,8% (w/v) KCl 0,4% (w/v) MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,132% (w/v) CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0,8% (v/v) Spurenelement-Lösung in dH ₂ O, sterilfiltriert

PD-Vollmedium	2,4% (w/v) Potato-Dextrose Broth 2,0% (w/v) Bactoagar in dH ₂ O, autoklaviert
PD-Charcoal	wie PD-Vollmedium, jedoch zusätzlich 1,0% (w/v) Aktivkohle

4.2.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen

Die Zelldichte von Bakterien- und Pilzflüssigkulturen wurde in einem NovaspecII Gerät (Pharmacia Biotech/GE Lifesciences, München) bei 600 nm (OD_{600nm}) photometrisch bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen wurden Kulturen durch entsprechende Verdünnungen auf Werte unter 0,8 verdünnt. Als Referenzwert wurde das entsprechende Kulturmedium verwendet. Bei *U. maydis* entspricht eine OD_{600nm} von 1 etwa einer Zellzahl von $1-5 \times 10^7$ Zellen. Bei *E. coli* entspricht selbiger Wert etwa 1×10^9 Bakterienzellen.

4.3 Stämme, Oligonukleotide und Vektoren

4.3.1 *E. coli* Stämme

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme und deren Verwendungszweck dargestellt.

Tabelle 6: Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm [Genotyp]	Verwendung	Referenz/Bezug
K-12 Top10 [F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacO</i> 74 <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>]	Plasmidamplifizierung/Klonierung	(Grant et al, 1990)/ Invitrogen (Karlsruhe)
K-12 DH5α [F ⁻ Φ80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_K⁻</i> , <i>m_K⁺</i>) <i>phoA supE44 λ⁻ thi1 gyr</i> A96 <i>relA1</i>]	Plasmidamplifizierung/Klonierung	(Hanahan, 1983)/ Gibco/BRL (Eggenstein)

4.3.2 *U. maydis* Stämme

In diesem Kapitel werden die verwendeten *U. maydis* Ausgangsstämme (Tabelle 7), sowie die in dieser Arbeit hergestellten Stämme (Tabelle 8), beschrieben.

Tabelle 7: *U. maydis* Ausgangsstämme.

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
SG200	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i>	ble	(Kämper et al, 2006)
AB33	<i>a2 P_{nar}:bW2, bE1</i>	ble	(Brachmann et al, 2001)
SG200Δ <i>mcs1</i> (#2049)	<i>a1 mfa2 bW2 bE1</i> Δ <i>mcs1::hyg^R</i>	ble, hyg	(Weber et al, 2006)
AB33 <i>mcs1G₃</i> (#3512)	<i>a2 b2 P_{nar1}:bW2, bE1</i> <i>mcs1G₃</i>	ble, hyg	Uta Fuchs, 2006
FB2Δ <i>Myo5</i>	<i>a2 P_{nar}-bW2 P_{nar}-bE1, Δ<i>myo5</i></i>	ble, hyg	(Weber et al, 2003)

Für die Stammbeschreibung wurden folgende Abkürzungen verwendet:

a, *b*, Paarungstyp Locus; *P*, Promotor; -, Fusion; Δ , Deletion; *hyg*, Hygromycin Resistenz-Kassette; *ble*, Phleomycin Resistenz-Kassette; *nat*, Nourseothricin Resistenz-Kassette; *cbx*, Carboxin Resistenz-Kassette; /, ektopisch integriert; *otef*, konstitutiver Promotor; *nar*, konditioneller Nitrat-Reduktase Promotor; *crg*, konditioneller Arabinose-induzierter Promotor; *E1*, *W2*, Gene des Paarungstyp Locus; *egfp* oder *G*, verstärktes grün-fluoreszierendes Protein; *mCh*, monomeres rot-fluoreszierendes Protein; *Sso1*, Syntaxin-ähnliches Plasma-Membran Protein; *Mcs1*: Myosin-chitin Syntase 1; *Myo1*: Klasse I Myosin; *Myo2*: Klasse II Myosin; *Myo5*: Klasse V Myosin; *HA*, Hämagglutinin Epitop-tag; *His*, Histidin Epitop-tag

Tabelle 8: Liste der in dieser Arbeit generierten *U. maydis* Stämme¹.

Nr.	Bezeichnung	Genotyp	Resistenz	Ausgangs-stamm
#5089	SG200 Δ mcs1G ₃ Mcs1	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1]ips</i>	ble, hyg, cbx	#2049
#5098	SG200 Δ mcs1- G ₃ Mcs1 Δ MM	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1 (Δmmd+50As)]ips</i>	ble, hyg, cbx	#2049
#5102	SG200 Δ mcs1- G ₃ Mcs1 ^{noAct}	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1 (noAct)]ips</i>	ble, hyg, cbx	#2049
#5116	SG200 Δ mcs1- G ₃ Mcs1 ^{ATPdead}	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1 (E407K)]ips, cbx</i>	ble, hyg, cbx	#2049
#5169	SG200 Δ mcs1- G ₃ Mcs1 ^{rigor}	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1 (G113E)]ips</i>	ble, hyg, cbx	#2049
#5092	SG200 Δ mcs1- G ₃ Mcs1 ^{ACC}	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1 (ΔCC)]ips</i>	ble, hyg, cbx	#2049
#5221	SG200 Δ mcs1 G ₃ Mcs1 ^{Δloop}	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1 (Δ565-628)]ips</i>	ble, hyg, cbx	#2049
#5175	SG200 Δ mcs1 G ₃ Mcs1H	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1 (Δchs)]ips</i>	ble, hyg, cbx	#2049
#5117	SG200 Δ mcs1 G ₃ Mcs1 ^{chsdead}	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1(D1436E, D1551E)]ips</i>	ble, hyg, cbx	#2049
#5105	SG200 Δ mcs1- myo1Hmcs1chsGFP	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1- myo1Hmcs1chsGFP]ips</i>	ble, hyg, cbx	#2049
#5014	AB33mcs1G ₃ - PergHAMyo1	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, Pmcs1-3gfp/ Perg-HA-myo1</i>	ble, hyg, cbx	#3512
#5016	AB33mcs1G ₃ - PergHAMyo1rigor	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, Pmcs1-3gfp/ Perg-HA-myo1(G142E)</i>	ble, hyg, cbx	#3512
#5020	AB33mcs1G ₃ - PergHAMyo2rigor	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, Pmcs1-3gfp/ Perg-HA-myo2(G206E)</i>	ble, hyg, cbx	#3512
#5026	AB33mcs1G ₃ - PergHAMyo5	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, Pmcs1-3gfp/ Perg-HA-myo5</i>	ble, hyg, cbx	#3512
#5028	AB33mcs1G ₃ - PergHAMyo5rigor	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, Pmcs1-3gfp,/ Perg-HA-myo5(G183E)</i>	ble, hyg, cbx	#3512
#5048	SG200 Δ mcs1G ₃ Mcs1_ mChSso1	<i>a1 mfa2 bW2 bE Δmcs1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1]ips/Potef-Cherry-Sso1</i>	ble, hyg, cbx, nat	#5089
#5049	SG200PotefmChSso1- G ₃ Mcs1	<i>a1 mfa2 bW2 bE/ Potef-Cherry-Sso1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1]ips</i>	ble, nat, cbx	#5004
#5053	SG200PotefmChSso1- G ₃ Mcs1 Δ MM	<i>a1 mfa2 bW2 bE/ Potef-Cherry-Sso1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1(ΔMM)]ips</i>	ble, nat, cbx	#5004

#5086	SG200PotefmChSso1-G ₃ Mcs1 ^{noAct}	<i>a1 mfa2 bW2 bE/ Potef-Cherry-Sso1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1(noAct)]ips</i>	ble, nat, cbx	#5004
#5067	SG200PotefmChSso1-G ₃ Mcs1 ^{ATPdead}	<i>a1 mfa2 bW2 bE/ Potef-Cherry-Sso1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1(ATPdead)]ips</i>	ble, nat, cbx	#5004
#5084	SG200PotefmChSso1-G ₃ mcs1 ^{rigor}	<i>a1 mfa2 bW2 bE, ble / Potef-Cherry-Sso1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1(G113E)]ips</i>	ble, nat, cbx	#5004
#5083	SG200PotefmChSso1-G ₃ Mcs1 ^{chsdead}	<i>a1 mfa2 bW2 bE/ Potef-Cherry-Sso1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1(D1436E, D1551E)]ips</i>	ble, nat, cbx	#5004
#5068	SG200PotefmChSso1-G ₃ Mcs1H	<i>a1 mfa2 bW2 bE/ Potef-Cherry-Sso1/ ipr[Pmcs1-3gfp-mcs1(Δchs)]ips</i>	ble, nat, cbx	#5004
#5211	AB33Mcs1G ₃ -Myo1T	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, Pmcs1-3gfp / PcrG-HA-myo1T(725-1282)</i>	ble, hyg, cbx	#3512
#5213	AB33Mcs1G ₃ -Myo2T	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, Pmcs1-3gfp / PcrG-HA-myo2T(845-1830)</i>	ble, hyg, cbx	#3512
#5215	AB33Mcs1G ₃ -Myo5T	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, Pmcs1-3gfp/ PcrG-HA-myo5T(943-1611)</i>	ble, hyg, cbx	#3512
#5115	SG2002RFP	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 / Potef-2rfp</i>	ble, cbx	SG200
#5154	SG2002RFP-G ₃ Mcs1	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 / Potef-2rfp/ Pmcs1-3gfp-mcs1</i>	ble, hyg, cbx	#5115
#3608	AB33rMcs1G ₃	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, PcrGmcs1-mcs1-3xgfp</i>	ble, hyg, nat	AB33
#5176	FB2PcrGHAmcs1mmd (ohne linker)	<i>a2b2 / PcrG-HA-mcs1mmd(ohne linker)</i>	cbx	FB2
#5179	FB2PcrGHAmcs1mmd (mit linker)	<i>a2b2 / PcrG-HA-mcs1mmd(mit linker)</i>	cbx	FB2
#5180	FB2PcrG6xHisMcs1mmd (ohne linker)	<i>a2b2 / PcrG-6xHis -mcs1mmd(ohne linker)</i>	cbx	FB2
#5182	FB2PcrG6xHis mcs1mmd (mit linker)	<i>a2b2 / PcrG-6xHis -mcs1mmd(mit linker)</i>	cbx	FB2
#5109	AB33Mcs1G ₃ -LifeActmCh	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, Pmcs1-3gfp/ Potef-LifeAct-mCherry</i>	ble, hyg, cbx	#3512
#5204	AB33Mcs1G ₃ -myo1mCherry	<i>a2 Pnar-bW2 Pnar-bE1, Pmcs1-3gfp/ Potef-myo1-mCherry</i>	ble, hyg, cbx	#3512

¹ Die zur Herstellung der Stämme verwendeten Plasmide sind in Abschnitt 4.3.4 aufgeführt. Bei Mutanten mit Integrationen im *ip*-Lokus wurden wenn möglich Stämme mit Einzelintegration verwendet. Ausnahmen sind im Stammverzeichnis vermerkt. Die Nomenklatur für Integrationen im *ip*-Lokus wurde aus Brachmann (2001) übernommen (Brachmann et al, 2001).

4.3.3 Oligonukleotide

In der Tabelle 9 werden alle in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Oligonukleotide aufgeführt. Die Oligonukleotide tragen eine OST-Laufnummer.

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide¹.

Laufnr.	5'-3'-Sequenz	Verwendung
OST127	<u>GCC</u> ATGCAAGCTTCAGCTGCTCGAGTT C	Primer für inverse PCR auf Plasmid #1079 zum Austausch des <i>otef</i> -Promotors, führt <i>NheI</i> -Schnittstelle ein
OST128	<u>TAG</u> CCCCCGGGCTGCAGGAATTCG	Primer für inverse PCR auf Plasmid #1079 zum Austausch des <i>otef</i> -Promotors, führt <i>NheI</i> -Schnittstelle ein
OST129	CAC <u>GCTAGC</u> CTCGGCTCGTGGCTTGAA GAG	Amplifizierung der 5'-Flanke von <i>mcsI</i> zum Austausch des <i>otef</i> -Promotors, führt <i>NheI</i> -Schnittstelle ein
OST130	GTC <u>GCTAGC</u> TATGGCGACTTTGCGTAC CAGG	Amplifizierung der 5'-Flanke von <i>mcsI</i> zum Austausch des <i>otef</i> -Promotors; führt eine <i>NheI</i> -Schnittstelle ein
OST5	CTGTGTCAACTTTGCCTGCaAGAACCTT CACCGCTTCATGC	Mutageneseprimer der <i>mcsI</i> -Motordomäne; ATPdead E407K
OST6	GCATGAAGCGGTGAAGGTTCTTGCAGG CAAAGTTGACACAG	Mutageneseprimer der <i>mcsI</i> -Motordomäne; ATPdead E407K
OST77	<u>ATT</u> CCCGTGTCAAGGTGTTCCCTTTC	Primer für inverse PCR zur Deletion der <i>mcsI</i> -Motordomäne nach 50 As; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST78	<u>TC</u> CTGTTGCGGTTTCCAGACGAGGCG	Primer für inverse PCR zur Deletion der <i>mcsI</i> -Motordomäne nach 50 As; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST79	<u>ATT</u> CGCGCGGCGAATCGGACCC	Primer für inverse PCR zur Deletion der Coiled-coil domäne; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST80	<u>TC</u> GCCGTATGCGAAAGGAACACC	Primer für inverse PCR zur Deletion der Coiled-coil domäne; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST119	<u>TC</u> GGTGTTGAAGATGCCGCGGATAAAG GG	Primer für inverse PCR zur Deletion des „loops“ (As 565-628); führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST120	<u>ATT</u> CTCCACTTCTAAGAAGAACGCCGT TCGATGTGTC	Primer für inverse PCR zur Deletion des „loops“ (As 565-628); führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST83	<u>ATT</u> CCGTTCTCTCCGAGTCGTA	Primer für inverse PCR zur Deletion der CHS-domäne; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST84	<u>TC</u> GAGGGAGCGCCGCTGAGG	Primer für inverse PCR zur Deletion der CHS-domäne; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST95	TCGAGTGA CTT GGAGGAGATGCCG	Primer für inverse PCR zur Deletion der Aktinbindenden Region; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST96	<u>GAAT</u> TCGATGCCGACGGTGCTTCGGA C	Primer für inverse PCR zur Deletion der Aktinbindenden Region; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST166	CGGAGACACCTCAAGCGAAAAGAGCG AAGTTCGTCGTC	Mutageneseprimer der <i>mcsI</i> -Motordomäne; rigor G113E
OST167	GACGACGA ACT TCGCTCTTTTCGCTTG AGGTGTCTCCG	Mutageneseprimer der <i>mcsI</i> -Motordomäne; rigor G113E
OST176	CGAGTACATTCTGCAGGTCGAAGCCGA TACCGAAGTTGAGGC	Mutageneseprimer der <i>mcsI</i> -Chitinsynthase-Domäne; chsdead D1436E
OST177	CTGCATCTGGGTGAAGAGCGTTACCTG ACGACGTTGGTGCTC	Mutageneseprimer der <i>mcsI</i> -Chitinsynthase-Domäne; chsdead D1551E
OST107	GT <u>ACCC</u> GGGATGGCTATCTCGAAAAAG GCTGGC	Amplifizierung der <i>myoI</i> -Motordomäne führt eine <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein

OST108	GAT <u>CCCCGGGGCTAGCGTATCGATCGCG</u> CATGGTCTCGAG	Amplifizierung der <i>myo1</i> -Motordomäne führt eine <i>XmaI</i> - und <i>NheI</i> -Schnittstelle ein
OST109	GAGGCTAGCCATACGGCTTTCCGCGAG CTC	Amplifizierung der <i>mcs1</i> -Chitinsynthase-Domäne mit linker mit <i>NheI</i> -Schnittstelle
OST110	GCAGCTAGCCGACTCGGAGAGAACGTT TTC	Amplifizierung der <i>mcs1</i> -Chitinsynthase-Domäne mit linker mit <i>NheI</i> -Schnittstelle
OST54	GAATTCTCAGTTGAGGAGTTTACGCGA CATC	Amplifizierung der <i>mcs1</i> -Motordomäne ohne linker; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST55	GAATTCTCAAGTCGAGCTGACGCCAAC	Amplifizierung der <i>mcs1</i> -Motordomäne mit linker; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST43	TGAAGCTTCTGTGCGACGCAGAGTAG	Amplifizierung der 5'-Flanke für <i>mcs1 crg</i> -3GFP-Konstrukt mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle
OST44	GTACTAGTGCGTACCAGGTGCACAGC	Amplifizierung der 5'-Flanke für <i>mcs1 crg</i> -3GFP-Konstrukt mit <i>SpeI</i> -Schnittstelle
OST45	ACATGTCGGCTCTCGACGAGG	Amplifizierung der ORF-Flanke für <i>mcs1 crg</i> -3GFP-Konstrukt; führt <i>PciI</i> -Schnittstelle ein
OST46	TGGAATTCCGTCACGGTGGTCCGAAG	Amplifizierung der ORF-Flanke für <i>mcs1 crg</i> -3GFP-Konstrukt; führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
OST47	ACCATGGCCTCGGCTCTCGACGAG	Amplifizierung der ORF-Flanke für <i>mcs1 crg</i> -3GFP-Konstrukt; führt <i>NcoI</i> -Schnittstelle ein
OST114	GGGATGTATATCGCCAGCTGAAAGTGA AAC	Primer für inverse PCR auf Plasmid #940 für <i>crgha</i> Expression; führt <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein
OST115	GGGTTCGATGGGGATCTTCGCTCAACT CGTCTC	Primer für inverse PCR auf Plasmid #940 für <i>crgha</i> Expression; führt <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein
OST118	GGGATGAGTAGCGTAATCTGGAACGTC GTATGG	Primer für inverse PCR auf Plasmid #984 für <i>crgha</i> Expression; führt <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein
OST125	CAACCCGGGATGGCACCCGCACCTGCC	Amplifizierung des <i>myo5</i> -ORFs incl. Terminator-Region; führt <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein
OST126	CAACCCGGGGAAGTCTGAGTCTGAATCCA GACTCCAG	Amplifizierung des <i>myo5</i> -ORFs incl. Terminator-Region; führt <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein
OST116	CACCCCGGGATGGTCGACGTCGTACGT AC	Amplifizierung des <i>myo2</i> -ORFs incl. Terminator-Region; führt <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein
OST117	CACCCCGGGCTAGTGCATACTCAACGC GC	Amplifizierung des <i>myo2</i> -ORFs incl. Terminator-Region; führt <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein
OST111	GGGCGAGTCTGGCGCAGAGAAGACTG AAGCTGCCAAG	Mutageneseprimer der <i>myo1</i> -Motordomäne; rigor G142E
OST112	CTTGGCAGCTTCAGTCTTCTCTGCGCCA GACTCGCCCCG	Mutageneseprimer der <i>myo1</i> -Motordomäne; rigor G142E
OST121	ACCGGTGAATCCGGTGCTGAGAAGACC GAAAACACAAAGAAAGTCATTACG	Mutageneseprimer der <i>myo2</i> -Motordomäne; rigor G206E
OST122	CTGAATGACTTTCTTTGTGTTTTTCGGTC TTCTCAGCACCGGATTACCGGT	Mutageneseprimer der <i>myo2</i> -Motordomäne; rigor G206E
OST123	CGGTGAGTCCGGTGCCGAGAAGACGG TATCCGCAAAGTAC	Mutageneseprimer der <i>myo5</i> -Motordomäne; rigor G183E
OST124	GTACTTTGCGGATACCGTCTTCTCGGC ACCGGACTCACCG	Mutageneseprimer der <i>myo5</i> -Motordomäne; rigor G183E
OST133	GGCGCGCCCTTGACAGCTCGTCCATG CC	Primer für inverse PCR auf Plasmid #1103 für die <i>otefmChSso1</i> Expression, <i>AscI</i> -Schnittstelle ein
OST134	GGCGCCGTAATCATGGTCATAGCTGTT TCC	Primer für inversePCR auf Plasmid #1103 für die <i>otefmChSso1</i> Expression, <i>AscI</i> -Schnittstelle ein
OST135	GACGGCGCGCCTATGCAGCAAACATCA CCC	Amplifizierung von <i>sso1</i> incl. 3'-Flanke, führt <i>AscI</i> -Schnittstelle ein
OST136	CAGGGCGCGCCCTTGATCTGCAACACC GTCC	Amplifizierung von <i>sso1</i> incl. 3'-Flanke, führt <i>AscI</i> -Schnittstelle ein

OST168	GCATCTGTCCGTATCCGG	Sequenzierprimer für <i>sso1</i>
OST169	GGAGGAGGCAACAACGGC	Sequenzierprimer für <i>sso1</i>
OST170	GCCGAGCGCCAATTTTCGC	Sequenzierprimer für <i>sso1</i>
OST171	GCAGCGTCGTGAATGCCAAG	Sequenzierprimer für <i>mcs1</i> rev
mcs1-2	GTTTTCCGACTCGGGCAAGC	Sequenzierprimer für <i>mcs1</i>
mcs1-3	CCGACGAGGGCATCAGCCAC	Sequenzierprimer für <i>mcs1</i>
mcs1-4	GAGTACAGCGTCAGCATGAC	Sequenzierprimer für <i>mcs1</i>
mcs1-5	GCGCTTGTGCCGTCTTTGTG	Sequenzierprimer für <i>mcs1</i>
mcs1-6	CCTTGCTGCACTCCAGTTTG	Sequenzierprimer für <i>mcs1</i>
mcs1-7	CGCTTCGCAGATTGTGGAAG	Sequenzierprimer für <i>mcs1</i>
mcs1-8	GCAAGCTTCGGACACAGCCC	Sequenzierprimer für <i>mcs1</i>
OST89	CATGTTCAACGCACAC	Sequenzierprimer für <i>myo1</i>
OST90	GAGCTCCAACGTCATC	Sequenzierprimer für <i>myo1</i>
OST91	CCGCACCATCAAGCCC	Sequenzierprimer für <i>myo1</i>
OST143	GTCCACGCTTCCTGATCC	Sequenzierprimer für <i>myo1</i>
OST144	GCACGCTACAAGGCGCTG	Sequenzierprimer für <i>myo1</i>
OST146	GCACGCTACAAGGCGCTG	Sequenzierprimer für <i>myo2</i>
OST147	GGCGGCGCTCAGCAAGAC	Sequenzierprimer für <i>myo2</i>
OST148	CTGAGTACGCCGAGGTCG	Sequenzierprimer für <i>myo2</i>
OST149	GCACTCGAGGCCCTCAAG	Sequenzierprimer für <i>myo2</i>
OST150	CGGTCTCAAGGTCAGTACG	Sequenzierprimer für <i>myo2</i>
OST151	GCTTGCAGCAGCTCGTGG	Sequenzierprimer für <i>myo2</i>
OST152	GATGAGCTGAGGAGGGGC	Sequenzierprimer für <i>myo2</i>
OST153	GGCACCCGCACCTGCCG	Sequenzierprimer für <i>myo5</i>
OST154	GACAACTCGTCGCGCTTC	Sequenzierprimer für <i>myo5</i>
OST155	CGTTTCAAGGTCAACTCG	Sequenzierprimer für <i>myo5</i>
OST156	CGTCCTCGGCCAGCTCCG	Sequenzierprimer für <i>myo5</i>
OST157	GGCACGACGGAACGAAGC	Sequenzierprimer für <i>myo5</i>
OST158	CGGTCGCTTTTGCCCTCG	Sequenzierprimer für <i>myo5</i>
OST159	GTGTGGAAGAGTCTCAAGAG	Sequenzierprimer für <i>myo5</i>
myo5-rev	GAGGCGCGAACGTTTCGAGCAG	Sequenzierprimer für <i>myo5</i> rev
<i>ppi</i>-FW	ACATCGTCAAGGCTATCG	Quantifizierung der Infektion mittels qRT-PCR
<i>ppi</i>-RV	AAAGAACACCGGACTTGG	Quantifizierung der Infektion mittels qRT-PCR
<i>gapdh</i>-FW	CTTCGGCATTGTTGAGGGTTTG	Quantifizierung der Infektion mittels qRT-PCR
<i>gapdh</i>-RV	TCCTTGGCTGAGGGTCCGTC	Quantifizierung der Infektion mittels qRT-PCR

¹ Die Tabelle zeigt die Laufnummer der Oligonukleotide, die Sequenz (5'-3') und die Verwendung. Restriktionsschnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen.

4.3.4 Vektoren

Alle dargestellten Vektoren und Plasmide wurden mittels Restriktionsanalysen überprüft. Plasmidteile, die durch PCR amplifiziert wurden, wurden durch Sequenzierungen abgesichert. Soweit nicht anders vermerkt vermitteln die Plasmide Amp-Resistenz.

4.3.4.1 TA-Vektoren

pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die enthaltenen DNA-Abschnitte können mit *EcoRI* herausgeschnitten werden. Das Plasmid kann für die Blau-Weiß-Selektion verwendet werden.

4.3.4.2 Plasmide zur Expression von Genen in *E. coli*

pET15b (Novagen, Madison/USA)

Leervektor für die Expression von Genen in *E. coli*. Der Vektor enthält einen T7-Promotor und wird für die 5'-Ende Fusion von Genen an eine Sequenz, die für einen 6xHis-tag kodiert, verwendet.

pET15b-Mcs1mmd

Dieses Plasmid wurde generiert, um die Mcs1 Motordomäne (incl. Linker-Region) *in vitro* herzustellen. Dabei wurde die *mcs1*-Motor Sequenz am 5'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für einen 6xHis-tag kodiert.

pET15b-Mcs1mmd (rigor)

Dieses Plasmid wurde generiert, um die Mcs1 Motordomäne (incl. Linker-Region) *in vitro* herzustellen. Dabei wurde die *mcs1*-Motor Sequenz am 5'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für einen 6xHis-tag kodiert und die Punktmutation G113E mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt.

4.3.4.3 Plasmide zur Generierung von stabilen *U. maydis* Mutanten

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsplasmide sowie die selber hergestellten Plasmide beschrieben, die zur Gewinnung stabiler *U. maydis* Mutanten zum Einsatz kamen.

p123 (Aichinger et al. 2003)

p123-Derivat, das *egfp* unter Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators enthält. Das Plasmid kann nach Linearisierung im *cbx*-Gen in *U. maydis* durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus integriert werden.

pSL123 1180

Dieser Klonierungsvektor enthält eine *multiple cloning site* und eine Amp^R-Kassette.

pBS-hhn

Enthält eine 1884 bp lange Hyg-Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment. Das *hph*-Gen wird dabei von dem *hsp70*-Promotor und dem *nos*-Terminator kontrolliert. Die aus pBS-hhn gewonnene Resistenzkassette wurde standardmäßig für Einzel-Deletionskonstrukte verwendet.

#934 pCR2.1-TOPO-KOmyo1

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für *myosin1*, das eine Hyg^R-Kassette einschließt. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn.

#935 pCR2.1-TOPO-KOmyo2

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für *myosin2*, das eine Hyg^R-Kassette einschließt. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn.

#960 pSL-Pcrg-mcs1mmd

Dieses Plasmid ist ein pSL123 1180-Derivat und enthält 3,6 kb des induzierbaren *crg*-Promotors vor dem *mcs1*-Startcodon sowie eine Nat^R-Kassette.

#4334 p123-Pmcs1-3GFP-mcs1

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200Δ*mcs1* für die Funktionsanalyse der *mcs1*-Motordomäne verwendet. Dem *mcs1* Gen ist eine etwa 1kb-lange Promotorregion und das *3xegfp*-Gen vorgeschaltet. Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR, wobei das Plasmid pOGMcs1 (Weber et al, 2006) als Matrize diente. Die für den *otef*-Promotor kodierende Region wurde dabei entfernt und durch den nativen Promotor ersetzt. Das *egfp*-Gen wurde durch ein *3xegfp*-Gen ausgetauscht.

#4335 p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 (ATPdead)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200Δ*mcs1* für die Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Die Punktmutation E407K wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt.

#4356 p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 (rigor)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200Δ*mcs1* für die Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Die Punktmutation G113E im P-loop wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt.

#4341 p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 (Δ MM)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ mcs1 für die Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Dieses Plasmid entstand mittels inverser PCR, wobei das Plasmid p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 als Matrize diente. Die für die As 57-753 (Motordomäne) von Mcs1 kodierenden Basenpaare wurden dabei deletiert.

#4342 p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 (Δ CC)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ mcs1 für die Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Dieses Plasmid entstand mittels inverser PCR, wobei das Plasmid p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 als Matrize diente. Die für die As 764-795 (Coiled coil Region) von Mcs1 kodierenden Basenpaare wurden dabei deletiert.

#4344 p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 (Δ chs)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ mcs1 für die Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Dieses Plasmid entstand mittels inverser PCR, wobei das Plasmid p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 als Matrize diente. Die für die As 879-2005 (Chitinsynthesedomäne) von Mcs1 kodierenden Basenpaare wurden dabei deletiert.

#4345 p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 (noAct)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ mcs1 für die Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Dieses Plasmid entstand mittels inverser PCR, wobei das Plasmid p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 als Matrize diente. Die für die As 319-339 (Aktin-Bindedomäne) von Mcs1 kodierenden Basenpaare wurden dabei deletiert.

#4346 p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 (Δ loop)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ mcs1 für die Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Dieses Plasmid entstand mittels inverser PCR, wobei das Plasmid p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 als Matrize diente. Die für die As 565-628 (nicht konservierter loop) von Mcs1 kodierenden Basenpaare wurden dabei deletiert.

#4368 p123-Pmcs1-3GFP-mcs1 (chsdead)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ mcs1 für die Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Die Punktmutationen D1436E und D1551E wurden mit Hilfe des QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt.

#4353 p123-Pmcs1-3GFP-myo1mmd-mcs1chs

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ mcs1 für die Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Die Myosin1-

Motordomäne (As 1-725) wurde an die Mcs1-Chitinsynthase-Domäne (As 761-2005) fusioniert.

#1141 p123-Pcrg-3GFP-myo1

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin1 verwendet. Dem *myosin1* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und das *3xegfp*-Gen vorgeschaltet.

#1142 p123-Pcrg-HA-myo1

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin1 verwendet. Dem *myosin1* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet.

#1143 p123-Pcrg-3GFP-myo1(rigor)

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin1 verwendet. Dem *myosin1* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und das *3xegfp*-Gen vorgeschaltet. Die Punktmutation G142E im P-loop wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt.

#1144 p123-Pcrg-HA-myo1(rigor)

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin1 verwendet. Dem *myosin1* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet. Die Punktmutation G142E im P-loop wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt.

#4324 p123-Pcrg-3GFP-myo2

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin2 verwendet. Dem *myosin2* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und das *3xegfp*-Gen vorgeschaltet.

#4325 p123-Pcrg-HA-myo2

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin2 verwendet. Dem *myosin2* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet.

#4326 p123-Pcrg-3GFP-myo5

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin5 verwendet. Dem *myosin5* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und das *3xegfp*-Gen vorgeschaltet.

#4327 p123-Pcrg-HA-myo5

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin5 verwendet. Dem *myosin5* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet.

#4328 p123-Pcrg-3GFP-myo2(rigor)

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin2 verwendet. Dem

myosin2 Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und das *3xegfp*-Gen vorgeschaltet. Die Punktmutation G206E im P-loop wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt.

#4329 p123-Pcrg-HA-myo2(rigor)

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin2 verwendet. Dem *myosin2* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet. Die Punktmutation G206E im P-loop wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt.

#4330 p123-Pcrg-3GFP-myo5(rigor)

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin5 verwendet. Dem *myosin5* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und das *3xegfp*-Gen vorgeschaltet. Die Punktmutation G183E im P-loop wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt.

#4331 p123-Pcrg-HA-myo5(rigor)

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisations- und Funktionsanalyse von Myosin5 verwendet. Dem *myosin5* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet. Die Punktmutation G183E im P-loop wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt.

#4361 p123-Pcrg-HA-mcs1mmd ohne linker

Dieses Plasmid wurde zur Überexpression und Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Den, für die Mcs1-Motordomäne (As 1-700), kodierenden Basenpaaren ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet.

#4362 p123-Pcrg-HA-mcs1mmd mit linker

Dieses Plasmid wurde zur Überexpression und Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Den, für die Mcs1-Motordomäne (As 1-926), kodierenden Basenpaaren ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet.

#4363 p123-Pcrg-6xHis-mcs1mmd ohne linker

Dieses Plasmid wurde zur Überexpression und Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Den, für die Mcs1-Motordomäne (As 1-700), kodierenden Basenpaaren ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein 6xHis-tag vorgeschaltet.

#4364 p123-Pcrg-6xHis-mcs1mmd mit linker

Dieses Plasmid wurde zur Überexpression und Funktionsanalyse der Mcs1-Motordomäne verwendet. Den, für die Mcs1-Motordomäne (As 1-926), kodierenden Basenpaaren ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein 6xHis-tag vorgeschaltet.

#4407 p123-Pcrg-HA-myo1tail

Dieses Plasmid wurde zur Überexpression der C-terminalen Region von Myosin1 verwendet. Dem *myosin1* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet.

#4408 p123-Pcrg-HA-myo2tail

Dieses Plasmid wurde zur Überexpression der C-terminalen Region von Myosin2 verwendet. Dem *myosin2* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet.

#4409 p123-Pcrg-HA-myo5tail

Dieses Plasmid wurde zur Überexpression der C-terminalen Region von Myosin5 verwendet. Dem *myosin5* Gen ist der induzierbare *crg*-Promotor und ein HA-tag vorgeschaltet.

#4397 p123-otef-3GFP-myo1

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisation von Myosin1 verwendet. Das *myosin1*-Gen ist N-terminal an das *3xegfp*-Gen fusioniert. Beide Gene werden durch den *otef*-Promotor konstitutiv expremiert.

#4398 p123-otef-myo1-GFP

Dieses Plasmid wurde für die Lokalisation von Myosin1 verwendet. Das *myosin1*-Gen ist C-terminal an das *egfp*-Gen fusioniert. Beide Gene werden durch den *otef*-Promotor konstitutiv expremiert.

#4347 pBS-otef-mCherry-hyg

Klonierungsvector für mCherry-Sso1 Fusionen. Dieses Plasmid entstand mittels inverser PCR, wobei das Plasmid #1103 als Matrize diente. Es enthält das *mCherry*-Gen unter Kontrolle des *otef*-Promotors und die Hyg^R-Kassette für ektopische Integration.

#4348 pBS-otef-mCherry-sso1-hyg

Dieses Plasmid enthält das *sso1*-Gen (incl. 3'-Terminator-Region), das am N-terminus an das *mCherry*-Gen fusioniert ist. Beide Gene werden durch den *otef*-Promotor konstitutiv expremiert. Dieses Plasmid enthält eine Hyg^R-Kassette und wird ektopisch integriert.

#4349 pBS-otef-mCherry-sso1-nat

Dieses Plasmid enthält das *sso1*-Gen (incl. 3'-Terminator-Region), das am N-terminus an das *mCherry*-Gen fusioniert ist. Beide Gene werden durch den *otef*-Promotor konstitutiv expremiert. Dieses Plasmid enthält eine Nat^R-Kassette und wird ektopisch integriert.

4.4 Mikrobiologische Standardmethoden

4.5 Standardmethoden für *E. coli*

4.5.1.1 Rubidium-Chlorid-vermittelte Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen et al, 1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem 10 mM MgCl_2 und 10 mM MgSO_4 zugesetzt waren, mit 1 ml einer frischen DH5 α - oder TOP10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0,5$ bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 μl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 μl mit bis zu 10 μl Plasmidlösung (1-5 ng DNA) bzw. Ligationsansatz versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 500 μl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 37°C horizontal mit 200 Upm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf YT-Platten mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10^6 Transformanten pro 1 μg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ 30 mM K-Acetat 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 15% (v/v) Glyzerin in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$, pH 5,8 (Acetat), sterilfiltriert
RF2-Lösung	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 15% (v/v) Glyzerin in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$, pH 5,8 (NaOH), sterilfiltriert

4.5.1.2 Blau-Weiß-Selektion von *E. coli* Transformanden

Die korrekte Insertion von PCR-Produkten in Plasmide, die sich für die Blau-Weiß-Selektion eignen (beispielsweise pCR-TOPO2.1 und II), bewirkt eine Unterbrechung des *lacZ*-Gens. Daher kann keine funktionelle β -Galactosidase exprimiert und das Substrat X-Gal nicht in einen blauen Indigofarbstoff gespalten werden. Kolonien, die Plasmide mit Insert enthalten, bleiben somit auf X-Gal-haltigen Platten weiß und kann man so leicht von den blauen Kolonien mit Vektoren ohne Insertion des gewünschten Konstrukts unterscheiden.

4.5.2 Kultivierung von *U. maydis*

4.5.2.1 Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Gillissen et al, 1992; Schulz et al, 1990). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml $\text{Yeps}_{\text{light}}$ -Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem $\text{Yeps}_{\text{light}}$ -Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal $\text{OD}_{600} = 1,0$) geschüttelt.

Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch zehnmünütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen Agarplatten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert.

SCS-Lösung	20 mM Na-Citrat, pH 5,8 1 M Sorbitol in H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert
STC-Lösung	10 mM Tris-Cl, pH 7,5 100 mM CaCl ₂ 1 M Sorbitol in H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert
STC/PEG-Lösung	15 ml STC 10 g PEG4000
Regenerations-Agar (Schulz <i>et al.</i> , 1990)	Top: 1,5 % (w/v) Bacto-Agar 1 M Sorbitol in Yeps _{light} Bottom: wie Top, zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

4.6 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 Isolierung von Nukleinsäuren

4.6.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA, die später für Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde mit Hilfe des QIAprep Mini Plasmid Prep Kits nach Herstellerangaben isoliert. Plasmide, die für Restriktionsanalysen verwendet wurden, wurden nach dem Prinzip der kochenden Lyse (Sambrook, 1989) Protokoll extrahiert. Dazu wurden 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur pelletiert (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 350 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 1 min bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 35 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 420 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 50 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren, welche jedoch relativ unsauber im Bezug auf Proteinverunreinigungen ist.

STET-Puffer	50 mM Tris-Cl, pH 8,0 50 mM Na ₂ -EDTA 8% (w/v) Saccharose 5% (v/v) Triton X-100 in H ₂ O _{bid.}
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 in H ₂ O _{bid.}
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM Na ₂ -EDTA*2H ₂ O

4.6.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Diese Methode wurde nach (Hoffman & Winston, 1987) modifiziert. 2 ml einer in Yeps_{Light}-Flüssigmedium angezogenen Übernachtskultur wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 20 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt. Nach 20-30-minütiger Zentrifugation zur Phasentrennung (14.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol *p.a.* gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 2 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 g/ml RNase A aufgenommen, bei 55°C für 15 min resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

<i>Ustilago</i> -Lysispuffer	50 mM Tris-Cl, pH 7,5 50 mM Na ₂ -EDTA 1% (w/v) SDS in H ₂ O _{bid.}
TE-Phenol/Chloroform	Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

4.6.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus *Z. Mays*

Zur Quantifizierung des Infektionsgrades durch *U. maydis* wurde genomische *Z. mays* DNA durch die gleiche Methode wie 4.6.1.2 extrahiert. Aus infizierten Pflanzen wurde nach 3 Tagen das 3. Blatt isoliert und 3 mal mit 0,1% Tween und 1-2 mal mit dH₂O waschen. Je Mutante und biologischem Replikat wurde von 10 Pflanzen ein 3 cm großes Fragment 0,5 cm unterhalb der Einstichstelle entfernt, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gefrorene Blattstücke wurden anschließend mit einem Pistellstiel grob zerstoßen und ein Aliquot (ca. 200-300µl in 2ml Eppi) entnommen. Vor der DNA-Extraktion wurde das Blattmaterial mit einem Eppendorf-Mörser unter fortwährender Stickstoffkühlung homogenisiert.

4.6.1.4 Gewinnung von RNA aus axenischer *U. maydis* Kultur

2 ml einer *U. maydis* Kultur mit einer OD_{600nm} von ~1 wurden geerntet, mit 0,3 g Glaskugeln (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versehen, pelletiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das gefrorene Zellpellet wurde in 600 µl AE-Puffer mit 1% (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600 µl AE-Phenol zugegeben und die Probe 30 s kräftig geschüttelt (Vibrax, IKA, Staufen). Der Zellaufschluss erfolgte bei 65°C und 1400 Upm (Eppendorf Thermomixer) für vier Minuten. Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 Upm, 20 min, 4°C) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Es folgte ein Extraktionsschritt mit 600 µl AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung wurde daraufhin mit 40 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml

Ethanol gefällt (1 h, -20°C). Nach erneuter Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4°C) wurde die RNA mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND_1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific/Fisher Scientific, Schwerte).

10X AE-Puffer

AE-Puffer:Lösung I	500 mM Na-Acetat 100 mM Na ₂ -EDTA*2H ₂ O
AE-Puffer:Lösung II	500 mM Essigsäure 99,7% 100 mM Na ₂ -EDTA*2H ₂ O

Lösung I in einem ausreichend großen Gefäß vorlegen und so lange Lösung II zugeben, bis pH 5,3 erreicht ist (ca. 150ml Lösung II pro Liter Lösung I).

4.6.1.5 Gewinnung von RNA aus infiziertem Maisgewebe

Für die Extraktion von RNA aus mit *U. maydis* infiziertem Maisgewebe wurden infizierte Bereiche (2 cm) des 3. Blattes 0,5 cm unterhalb der Einstichlöcher geernetet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Blattstückchen wurden anschließend zerkleinert, in Eppendorf-Gefäße überführt und mit einem Eppendorf-Mörser unter fortwährender Stickstoffkühlung homogenisiert. RNA wurde dann aus dem Pulver mittels der TRIzol-Extraktionsmethode (Invitrogen, Karlsruhe) oder dem MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA) nach Herstellerangaben präpariert. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND_1000 Spektrophotometer.

4.6.1.6 Quantitative Real-Time PCR

Für die Durchführung der quantitativen real-time PCR (qPCR) wurde RNA aus infiziertem Maisgewebe extrahiert. DNA Reste in den RNA-Proben wurden mittels des „Turbo DNA-free“ Kits (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) entfernt und 1-2 µg RNA in cDNA revers transkribiert („SuperscriptIII First Strand Synthesis SuperMix“; Invitrogen, Karlsruhe). Die cDNA wurde für qRT-PCR Reaktionen eingesetzt, die mit Hilfe des „Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG“ Kits von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Als Referenzfarbstoff wurde Fluorescein (20 nM; Bio-Rad, München) eingesetzt. Die Reaktionen wurden in einem Bio-Rad iCycler-System unter der Verwendung des Programmes 95°C/2 min – [95°C/30 s – 62°C/30 s – 72°C/30 s] x 45 durchgeführt. Die Spezifität der Reaktionen wurde nach Beenden der PCR anhand der vom Gerät berechneten Schmelzkurve überprüft. Der „Threshold Cycle“ wurde mittels der Bio-Rad Software Version 3.0 ermittelt. Die relativen Expressionwerte wurden mit Hilfe des Programmes *Gene Expression Macro* (Bio-Rad, München) berechnet.

4.6.2 In vitro Modifikation von Nukleinsäuren

4.6.2.1 Restriktionen

Restriktionen von DNA wurden mittels Typ II-Restriktionsendonukleasen (NEB) für 1-12 h bei Enzym-spezifischer Temperatur durchgeführt. Die verdaut DNA wurde später auf Agarosegelen analysiert. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 – 2 µg reine DNA
2 µl enzymespezifischer 10 x NEB-Puffer 1-4
ggf. 2 µl 10x BSA
0,5 U Restriktionsendonuklease
ad 20 µl mit H₂O_{bid}.

4.6.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase (NEB) eingesetzt. In Ligationen, bei denen ein linearisierter Vektor mit einem Insert verbunden werden sollte, wurde die entsprechende DNA im äquimolaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. In Ligationen, bei denen zwei Flanken mit einer Restriktionskassette (für *U. maydis* Deletionskonstrukte) gekoppelt werden sollten, wurden die Flankenfragmente in einem molaren Verhältnis von 2:1 gegenüber der Resistenzkassetten-DNA eingesetzt. Die Ligationen wurden für mindestens eine Stunde bei RT durchgeführt. Ein typischer Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

n mol Vektor oder Resistenzkassetten-DNA
 5 x n mol bzw 2 x n mol Insert oder Flanken-DNA
 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer
 400U T4-DNA-Ligase
 ad 20 µl mit dH₂O

4.6.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Mittels Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der verwendeten Gele variierte zwischen 0,8% und 2,0%. Zur Herstellung der Gele wurde die jeweilige Menge an Agarose in 1x TAE oder 0,5x TBE durch aufkochen gelöst und anschließend (nach Erkaltung auf ca. 60°C) mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,25 µg/ml) versetzt. Das Gel wurde in flüssigem Zustand in eine Gelform gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dies in eine dafür vorgesehene Gelkammer transferiert und mit dem Puffer, mit dem auch das Gel angesetzt wurde, bedeckt. Das Gel wurde nun auf der Seite der Kathode mit DNA oder RNA in nicht denaturierendem Gelauftragspuffer beladen und bei ca. 5 - 10 V/cm einem elektrischen Feld ausgesetzt. Hierbei wanderte die DNA als poly-Anion langsam (in Abhängigkeit von Grösse und Agarosekonzentration) in Richtung Anode. Sichtbar gemacht wurde die DNA durch UV-Bestrahlung bei 254 nm. Die Dokumentation fand mit der Geldokumentationsanlage (BioDoc-IT-System, UVP) statt.

5x TBE-Puffer	440 mM Tris-Base 440 mM Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,0
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Base 2 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0
6x Gelauftragspuffer (nicht-denaturierend)	50% (v/v) Sucrose 0,1% (v/v) Bromphenolblau mit TE-Puffer-Wasser ansetzen

4.6.4 Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren (z. B. PCR- oder Restriktionsansätze) wurden mit dem Kit „Wizard SV Gel and PCR Purification System“ (Promega, Mannheim) aus Agarosegelfragmenten nach Herstellerangaben eluiert bzw. aufgereinigt.

4.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion angewendet. Je nach Anwendung wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Diese sind mit den entsprechenden typischen Ansätzen im Folgenden beschrieben. Dazu werden die im Ansatz enthaltenden Komponenten angegeben. Außerdem wird das PCR Programm, vereinfacht nach folgendem Schema dargestellt: Initiale Denaturierung/Dauer – [Denaturierung – Anlagerung – Elongation] x Zahl der Zyklen – finale Elongation dargestellt. Die Elongationszeiten wurden je nach Größe des zu

amplifizierenden Fragments und nach Synthesegeschwindigkeit des verwendeten Enzyms variiert. Die Anlagerungstemperaturen wurden *in silico* mittels des Programmes Clonemanager 9 (Sci-Ed Software, Cary/USA) bestimmt. Die PCR-Reaktionen wurden in der PCR-Maschine T-Personal (Biometra) durchgeführt.

PCR-Ansatz mit Phusion-Polymerase (Standardpolymerase bis ca. 6 kb; Finnzymes)

Ansatz ca. 50 µg Matrizen-DNA
 200 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)
 1 µM Primer 1 (bindet am 5' Strang)
 1 µM Primer 2 (bindet am 3' Strang)
 1 x konzentrierter HF- oder GC-Puffer (Finnzymes)
 0,5 U Phusion-Polymerase
 Programm: 98°C/30 s – [98°C/30 s – 55-74°C/15 s – 72°C/10s/kb] x 30-40 – 72°C/10 min

inversePCR-Ansatz mit Pfu-Ultra High-Fidelity DNA-Polymerase (Stratagene)

Ansatz ca. 10-20 ng Matrizen-DNA
 200 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)
 2 µM Primer 1 (bindet am 5' Strang)
 2 µM Primer 2 (bindet am 3' Strang)
 1 x konzentrierter Pfu-Ultra -Puffer (Stratagene, LaJolla/USA)
 1 U Pfu-Ultra High-Fidelity DNA-Polymerase
 Programm: 94°C/2 min – [94°C/30 s – 61°C/15 s – 68°C/1 min/kb] x 30-40 – 68°C/10 min

PCR-Ansatz mit RedMix (Kolonie-PCR/Screens im großen Maßstab; Bioline)

Ansatz 1 x konzentrierter RedMix
 1,25 µM Primer 1 (bindet am 5' Strang)
 1,25 µM Primer 2 (bindet am 3' Strang)
 1 µl Zellkultur bzw. 1 Kolonie (Pilze oder Bakterien)
 Programm: 94°C/2 min – [94°C/30 s – 50-65°C/20 s – 72°C/30 s/kb] x 30-40 – 72°C/10 min

4.6.6 Ortspezifische Mutagenese von Nukleinsäuren

Zur Nukleinsäuremutagenese zum gezielten Basenaustausch einer Base wurde das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, LaJolla/USA) verwendet. Mehrere Basenaustausche wurden mit dem „QuikChange Multi Kit“ (Stratagene, LaJolla/USA) nach Herstellerangaben erzielt.

4.6.7 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Plasmide, die die zu sequenzierenden Fragmente enthielten, wurden mittels des Kits „Plasmid Prep QiaPrep Plasmid Prep Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Konzentration der Plasmide wurde photometrisch bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte bei MWG (Martinsried). Alle Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977) durchgeführt (Sanger et al, 1977).

4.6.8 Analyse von gDNA Modifikationen mittels Southern-Blot

Diese Methode wurde modifiziert nach Southern (1975) durchgeführt (Southern, 1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Vor dem Transfer wurde das Gel für 20 min in 0,25 M HCl zur Depurinierung schüttelnd inkubiert, um auch den Transfer großer DNA-Fragmente zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH neutralisiert. Der Transfer erfolgte, indem die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt wurde. Die DNA-Fragmente werden durch

den Flüssigkeitsstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Der Kapillar-Blot erfolgte für mindestens 4 h.

4.6.8.1 Spezifischer Nachweis immobilisierter DNA über DIG-Markierung

Für den Nachweis von immobilisierter DNA über DIG-Markierung wurden vorwiegend mittels PCR hergestellte DNA-Fragmente mittels DIG High Prime (Roche) gemäß des Herstellerprotokolls markiert. Teilweise wurden die DNA-Sonden auch während der PCR mittels des PCR DIG Labelling Mix (Roche) wiederum nach Herstellerangaben hergestellt. Die so synthetisierten Sonden wurden für 10 min bei 99°C denaturiert und zu 30 ml auf 65°C vorgewärmten Southern- Hybridisierungspuffer gegeben. Nach halbstündiger Vorhybridisierung der Membran mit Southern-Hybridisierungspuffer bei 65°C (Hybaid Shake'n'Stack, Thermo Electron Corporation) in einer Hybridisierungsröhre wurde der Puffer entfernt und die in Southern-Hybridisierungspuffer gelöste, Hitze-denaturierte Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für mindestens sechs Stunden drehend im Hybridisierungssofen bei 65°C. Danach wurden die Membranen zweimal mit Southern Waschpuffer bei 65°C gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschrift mit DIG-Waschpuffer für 5 min, wurden die Membranen für 30 min in DIG2-Puffer inkubiert. Dann wurden die Membranen für 30 min mit Antikörperlösung geschwenkt. Der Antikörper ist dabei kovalent an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Um überschüssigen Antikörper von den Membranen zu entfernen, wurde zweimal für je 15 min mit DIG-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 5 min mit DIG3-Puffer äquilibriert, um den für die alkalische Phosphatase optimalen pH-Wert von 9,5 zu erreichen. Deren Substrat CDP Star (Roche) wurde 1:100 in DIG3 verdünnt und für 5 min zu den Membranen gegeben. Danach wurden die Membranen in Plastikfolie eingeschlagen und für 15 min bei 37°C inkubiert. Dadurch kann die lichtproduzierende Reaktion aktiviert werden. Die Membranen wurden dann in eine neue Folie überführt und in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) erfolgte je nach Intensität des Lichtsignals für 1 bis 30 min durch Auflegung des Filmes auf die eingeschlagene Membran. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60, Konica).

Southern-Hybridisierungspuffer	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 7% (w/v) SDS
Southern-Waschpuffer	0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1% (w/v) SDS
1 M Natriumphosphatpuffer	Lösung 1 1M Na ₂ HPO ₄ Lösung 2 1M NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O Lösung 1 in einem Gefäß vorlegen und solange Lösung 2 zugeben, bis pH 7,0 erreicht ist.
DIG1	0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 0,15 M NaCl
DIG2	1% (w/v) Milchpulver in DIG1
DIG3	0,1 M Maleinsäure, pH 9,5 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl ₂
DIG-Wasch	0,3% (v/v) Tween-20 in DIG1
CDP-Star-Lösung	100 µl-CDP-Star (Roche) in 10 ml DIG3

4.7 Proteinbiochemische Methoden

4.7.1 Antikörper

4.7.1.1 Kommerziell erworbene Antikörper

In dieser Arbeit wurden diverse Antikörper in Western-Blot-Analysen und Immundetektionen eingesetzt, die in Tabelle 10 zusammengefasst sind.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper mit eingesetzter Verdünnung und Herstellerangaben.

Antikörper	Verwendung	Bezug
Maus anti-HA	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von HA-Fusionsproteinen diente (1:10000 Verdünnung)	Sigma (Deisenhofen)
Maus anti-His	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von His-Fusionsproteinen diente (1:10000 Verdünnung)	Sigma (Deisenhofen)
Maus anti-GFP	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von GFP-Fusionsproteinen verwendet wurde (1:5000 Verdünnung)	Roche (Mannheim)
Maus anti-Aktin	Monoklonaler primärer Antikörper für die Detektion von Aktin (1:3000)	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Maus anti-Tubulin	Monoklonaler primärer Antikörper für die Detektion von Tubulin (1:2000)	Calbiochem/Merck (Darmstadt)

4.7.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus *U. maydis*

4.7.2.1 Gewinnung von denaturierten Proteinextrakten aus Flüssigkulturen

Proteinextrakte wurden nach einer von A. Straube beschriebener, leicht modifizierter Methode gewonnen (Straube et al, 2003). Dazu wurde eine *U. maydis* Kultur bei einer OD_{600nm} von 0,6 geerntet, mit 0,3 mg Glasperlen versetzt und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Pellet wurde dann in 6x-Probenpuffer resuspendiert (50 µl/ml Kultur) und für 10 min bei 99°C gekocht. Anschließend wurden Zelltrümmer bei 13000 upm für 10 min pelletiert und der Überstand (löslicher Proteinextrakt) in ein neues Gefäß überführt.

6x-Probenpuffer	300 mM Tris/HCl, pH 8,0 30% (v/v) Glycerin 20% (w/v) SDS 0,5 g/l Bromphenolblau 15% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben) in H ₂ O _{bid.}
-----------------	---

4.7.2.2 Gewinnung von Proteinextrakten von Membranproteinen

Dazu wurde das Pellet von 2-10ml einer *U. maydis* Kultur (OD_{600nm} $OD=0.5-0.8$) in 200µl Tris HCl (500mM, pH 8.5), 5 µl Inhibitormix (Roche) und 2.5µl PMSF (100x) versetzen. Nach Zugabe von ~100mg Glasperlen wurde der Ansatz für mindestens 10 min Vibrax (IKA-Werke) bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und mit 2x Harnstoffpuffer mit β-Mercaptoethanol (frisch zugeben) versetzen und 10min bei 37°C inkubiert.

2x Harnstoffpuffer	30 mM Tris/HCl, pH 6,8 9 M Harnstoff 5 mM EDTA 1,8% SDS 0,5 g/l Bromphenolblau 10% Glyzerin 0,7 M (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben) in H ₂ O _{bid.}
--------------------	---

4.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit dieser Methode werden denaturierte Proteine nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt, um Molekülgröße und Reinheit zu bestimmen oder um Proteingemische aufzutrennen. Zum vollständigen Denaturieren wird die Proteinlösung 5 min bei 99°C mit 1x SDS-Gelladepuffer mit β-Mercaptoethanol (50 µl/ml) erhitzt. So können sich die negativ geladenen SDS-Moleküle an die Proteine anlagern und verleihen diesen eine der Molekülmasse proportionale Ladung. Es wurden vertikale Gele (10,5 x 11,5 x 1 cm) verwendet (Mini Protean System, BioRad). Diese setzen sich aus Sammel- und Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Probe in einer Ebene vor dem Eintritt in das Trenngel, wobei die unterschiedliche Mobilität der Proteine in einem pH-Gradienten ausgenutzt wird. Dem Sammelgel werden Taschen zugefügt, in die die gekochte Probe eingefüllt werden kann. Im Trenngel werden die Proteine in der Probe durch ein Polyacrylamidnetz nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt, wobei größere Proteine langsamer durch das Gel wandern als kleinere. Das Molekularnetz ist bei höherprozentigen Gelen enger, so dass hiermit kleinere Proteine aufgetrennt werden können. Für die Auftrennung größerer Proteine werden Gele mit geringeren Acryl-/Bis-Acrylamidanteilen benutzt. Als Laufpuffer in der Gelkammer diente SDS-Laufpuffer. Die Molekülmasse der aufgetragenen Proteine wurde durch ein vorgefärbtes Proteinstandardgemisch (Prestained Protein Marker 15-170 kDa, Fermentas) bestimmt. Die angelegte Spannung betrug 100-200 V. Die Proteine wandern aufgrund ihrer durch die Anlagerung von SDS negativen Ladung von der Anode- zur Kathode.

SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 4 mM SDS
----------------	---

4.7.4 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Western-Blot)

Im Westernblot wurden Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und dort durch Immundekoration spezifisch detektiert. Für den Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran wurde ein Semi-DryBlot (Biometra) durchgeführt. Für den Blot wird 1 Lage 3 mm Whatman-Papier in Transfer-Puffer befeuchtet und mit der Nitrozellulose-Membran bedeckt. Auf die Membran wird blasenfrei das SDS-Gel gelegt und mit einem weiteren feuchten 3 mm Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer wurde für 60 min bei 40 mA/Gel durchgeführt.

Western-Transfer-Puffer	25 mM Tris-HCl, pH 10,4 192 mM Glycin 15% (v/v) Methanol
-------------------------	--

Die durch Western-Blotting auf Nitrozellulose-Membranen überführten Proteine wurden durch spezifische Antikörper detektiert. Dazu wurde die Membran mit Blockierlösung für mindestens eine Stunde inkubiert und anschließend für 1-12 h bei 4°C oder RT mit Antikörperlösung, die den primären Antikörper enthielt, geschwenkt. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit Antikörperlösung, welche den sekundären Antikörper enthielt, für eine Stunde inkubiert (RT). In dieser Arbeit wurden ausnahmslos Meerrettich-Peroxidase- (HRP; „horse raddish peroxidase“) Konjugate als sekundäre Antikörper verwendet. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurde die Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt, indem die Membran für fünf Minuten mit ECL-Reagenz (GE Healthcare) inkubiert wurde. Die Membranen wurden dann in eine Folie überführt und in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) erfolgte je nach Intensität des Lichtsignals für 1 bis 30 min durch Auflegung des Filmes auf die eingeschlagene Membran. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60; Konica, München).

TBS-T	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween20
Blockierlösung	5% (w/v) Milchpulver in TBS-T
Antikörperlösung	Antikörper verdünnt in 0,5% (w/v) Milchpulver in TBS-T

4.8 Pflanzenmethoden

4.8.1 Maisvarietäten (*Zea mays* sp.)

Für Infektionsversuche wurde ausschließlich die Maisvarietät Early Golden Bantam verwendet (Olds Seeds, Madison/USA).

4.8.2 Kultivierung von *Z. mays*

Maispflanzen des Kultivars Early Golden Bantam wurden in einem Gewächshaus kultiviert. Die Nachtphase mit 20°C und 60% Luftfeuchte dauerte 9 h, die Tagphase mit 28°C und 40% Luftfeuchte 15 h, wobei 2,5 h auf die Simulation des Sonnenaufgangs und 3,5 h für die Simulation des Sonnenuntergangs entfielen („ramping“). Die Beleuchtung betrug während der Tag Phase mindestens 28000 Lux (bei zusätzlicher Sonneneinstrahlung bis zu 90000 Lux). Jeweils vier Maiskörner wurden in Frühstorfer Pikiererde des Typs „P“ oder „T“ ausgesät und einmal täglich gewässert.

4.8.3 Infektion von *Z. mays* mit *U. maydis*

Die zu infizierenden Stämme wurden vorher über Nacht in Yeps_{light}-Flüssigkultur bis zu einer OD_{600nm} von 0,8-1,0 angezogen. Dann wurde die Kultur geerntet und in sterilem Wasser resuspendiert, so dass eine OD_{600nm} von 1,0 bzw. 3,0 erreicht wurde. Bei Standard-"Spritzeninfektionen" wurden 200 bis 500 µl dieser *U. maydis* Suspensionen in das Innere des Blattwirtels von sieben bis acht Tage alten Maispflanzen gespritzt. Die Injektionsstelle wurde etwa 1 cm über der Erde gewählt, also etwa 2,5 bis 3 cm oberhalb des basalen Pflanzenmeristems. Dabei werden in der Regel die Blattscheiden des ersten und des zweiten Blattes und die Blattspreiten des dritten und vierten Blattes durchstoßen.

4.8.4 Quantifizierung von *U. maydis* Infektionen

Für die Quantifizierung von Pathogenitätssymptomen nach Infektionen von *Z. mays* mit *U. maydis* wurden jeweils 6 und 12 Tage nach der Infektion die Symptome nach den folgenden Kriterien (Tabelle 11) klassifiziert. Die Pathogenität von Mutanten wurde aus in mindestens drei unabhängigen Infektionen von ungefähr 40 Pflanzen gewonnenen Werten gemittelt (vgl. (Kamper et al, 2006).

Tabelle 11: Klassifizierung der Symptome von Maispflanzen nach Infektion mit *U. maydis*.

Symptomklasse	Beschreibung des entsprechenden Phänotyps
Keine Symptome	Die Pflanze zeigt keinerlei Anzeichen einer Infektion
Chlorose	Die Pflanze zeigt gelblich-bleiche Verfärbungen an den infizierten Blättern (3. Blatt und jünger)
(Ligula-)Schwellung	Die Pflanze zeigt leichte Schwellungen an der Ligula oder an den Blättern
Kleine Tumore (< 1 mm)	Die größten Tumore auf der Pflanze sind ≤ 1 mm
Große Tumore (> 1 mm)	Die größten Tumore auf der Pflanze sind > 1 mm
Starke Tumorbildung/ Verkümmerung	Die Wachstumsachse der Pflanze krümmt sich aufgrund sehr starker Tumorbildung
Tote Pflanzen	Die Pflanze ist aufgrund der <i>U. maydis</i> Infektion eingegangen

4.8.5 Quantifizierung von *U. maydis* Infektionen mittels qPCR

Um die pilzliche Biomasse in infizierten Maispflanzen zu quantifizieren, wurde 8 Tage nach der Infektion mit *U. maydis*, 3 cm große Abschnitte des 3. äußeren Blattes, ~1 cm unterhalb der Einstichstelle, ausgeschnitten. Pilzmaterial auf der Blattoberfläche wurde durch 3-maliges Waschen mit 0,1% Tween20 und Wasser entfernt und die Blattabschnitte in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die darauffolgende DNA Extraktion wurden jeweils 10 Blattabschnitte zusammengefügt. Das infizierte Pflanzenmaterial wurde anschließend in flüssigem N₂ zu einem Pulver gemörsert, das anschließend in die gDNA-Extraktion eingesetzt wurde (vgl. 4.6.1.2). Die Quantitative Real-Time PCR wurde mit Hilfe des qPCR-Cyclers (Bio-Rad) in Kombination mit dem Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) durchgeführt. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet: 2 min 95°C, gefolgt von 45 Zyklen von 30 Sek. 95°C / 30 Sek. 61°C / 30 Sek. 72°C. Die ermittelten Ergebnisse wurden mit der iCycler™ Software (Bio-Rad) analysiert. Es wurden folgende Primer verwendet: 5'-ACATCGTCAAGGCTATCG-3' und 5'-AAAGAACACCGGACTTGG-3', zur Detektion des *U. maydis* Gens *um03726.1* (Peptidylprolyl *cis-trans* Isomerise (*ppi*), Accession Nummer EAK84904, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), das als Standard für die pilzliche Menge verwendet wurde. Die Primer GapDH-FW und GapDH-RV (5'-CTTCGGCATTGTTGAGGGTTTG-3' und 5'-TCCTTGGCTGAGGGTCCGTC-3') dienen der Detektion des Mais-„housekeeping“-Gens Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Accession Nummer CAA33620.1). Die relative Menge an Pilzmaterial in der Pflanze wurde durch einen Vergleich von pilzlicher DNA (*ppi*) zu pflanzlicher DNA (GapDH) ermittelt.

4.9 Färbungen, Mikroskopie und Bildverarbeitung

4.9.1 Färbung mit WGA/Alexafluor-488 von lebendem Gewebe

Um *on planta* Hyphen von *U. maydis* sichtbar zu machen, wurden Blattproben zwischen 1 und 2 Tagen nach Infektion geerntet. Dazu wurde das 3. Blatt entfernt und ein 2 cm langes Stück ca. 1 cm unterhalb der Einstichlöcher ausgeschnitten. Das Blattfragment wird für ca. 30 min in WGA/Alexafluor-488 (WGA/AF-488; 10 µg/ml) gefärbt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde die Mittellamelle herausgetrennt und das Präparat mit der Innenseite nach oben auf einen Objektträger gelegt.

4.9.2 Färbung mit WGA-Alexafluor-488 und Propidium-Iodid von fixierten Pflanzen

Die Färbung diente der Visualisierung von Pilzhypen (WGA/AF-488) in infizierten Pflanzen (3 dpi). Zusätzlich wurden Pflanzenzellwände mit Propidium-Iodid (PI) gegengefärbt. Außerdem können mit Propidium-Iodid tote Pflanzenzellen identifiziert werden, da sie eine verstärkte Färbung aufweisen. Die Blattproben wurden über Nacht (oder länger) in 100% Ethanol entfärbt. Anschließend wurden sie für drei Stunden in 10% KOH bei 85°C inkubiert. Die Inkubation in der Färbelösung erfolgt für 30 min, währenddessen wurden die Proben 3x 5 min vakuuminfiltriert. Nach erfolgter Färbung wurden die Proben in PBS entfärbt und dunkel bei 4°C bis zur Analyse durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie gelagert.

Stammlösungen:

WGA/AF-488	1 mg/ml in H ₂ O; Lagerung dunkel bei 4°C
Propidium-Iodid	10 mg/ml in PBS (pH 7,4); Lagerung bei 4°C
PBS (<i>phosphate-buffered saline</i>), pH 7,4	8 mM Na ₂ PO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 137 mM NaCl
Färbelösung	20 µg/ml Propidium-Iodid 10 µg/ml WGA/AF-488 0,02% Tween20 in 1x PBS (pH 7,4)

4.9.3 Färbung von Membranen mit FM4-64

Membranen von infiziertem Pflanzengewebe wurden modifiziert nach Kankanala (2007) mit dem Farbstoff FM4-64 (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) angefärbt (Kankanala et al, 2007). Dazu wurde der Farbstoff in Wasser auf eine Konzentration von 8 µM (Stocklösung: 1 mg/ml in DMSO) verdünnt. Um Membranen in infizierten Pflanzenblättern zu visualisieren, wurden Blattproben zwischen 1 und 2 Tagen nach Infektion geerntet. Dazu wurde das 3. Blatt entfernt und ein 2 cm langes Stück ca. 1 cm unterhalb der Einstichlöcher ausgeschnitten. Das Blattfragment wurde für 30 min – 1 h in der Farbstofflösung inkubiert, danach einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Ggf. wurden *on planta* Pilzhypen mit WGA/Alexafluor-488 gegengefärbt (s. 4.9.1).

4.9.4 Diaminobenzidinfärbung

Für Diaminobenzidin (DAB)-Färbungen wurden Blattspreiten infizierter Pflanzen (3. Blatt) geerntet und mit der Schnittfläche für 12 h in eine 1 mg/ml DAB (Diaminobenzidin, Sigma-Aldrich) Lösung inkubiert (RT/dunkel). Danach wurden die Blätter in einem Ethanol-Chloroform-Gemisch (4:1) bei 4°C entfärbt (1-2 Tage; dunkel) und mikroskopisch mit Hilfe einer Leica DFC 500 6.8 colour camera (Leica, Bensheim) analysiert. Konserviert wurden die Präparate in 10% Glyzerol bei dunkler Lagerung (RT).

4.9.5 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie und Bildverarbeitung

Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde ein TCS-SP5 (Leica, Bensheim) verwendet. Die Anregungs- sowie Emissionswellenlängen und der entsprechende dafür verwendete Laser sind für die verschiedenen Anwendungen in der Tabelle 12 dargestellt. Die Bildbearbeitung erfolgt vorwiegend mit zugehörigen LEICA Software (LAS AF; „Leica application suite“). DAB-Färbungen wurden zudem mit einer hochauflösenden Farbkamera visualisiert (DFC 500).

Tabelle 12: Für die unterschiedlichen Anwendungen verwendete Laser und die detektierten Emissionswellenlängen.

Laser	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge	Detektion
Argon Laser	488 nm	500-540 nm	WGA-AF488
Argon-Laser	488 nm	495-530 nm	GFP
405 Diode	405 nm	415-460 nm	Autofluoreszenz
561 nm DPSS Laser	561 nm	580-660 nm	RFP; FM4-64; PI, mCherry

4.9.6 Epifluoreszenz Mikroskopie

Ein Teil der Mikroskopie wurde im Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology (AG Doehlemann und AG Kahmann) in Marburg durchgeführt. Für die *in vivo* Beobachtung von *U. maydis*-Zellen wurden 1 µl einer logarithmisch wachsenden Kultur auf einem mit 2%-iger Low-Melt-Agarose überzogenen Objektträger plaziert und sofort mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop (Zeiss) betrachtet. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 63- und 100-faches Plan-Apochromat Objektiv (Zeiss) verwendet. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: Rhodamin, 546 nm und >590 nm; GFP; 450-490 nm und 515-565 nm. Bilder wurden mit gekühlten CCD-Kameras (C4742-25, Hamamatsu und CoolSNAP-HQ, Photometrics) aufgenommen, die von den Programmen ImageProPlus (Media Cybernetics) bzw. MetaMorph (Universal Imaging) gesteuert wurden.

4.9.7 Laser-basierte Epifluoreszenz-Mikroskopie und FRAP (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*)

Ein Teil der Mikroskopie wurde in der School of Biosciences, University of Exeter, Stocker Road, Exeter EX4 4QD, UK durchgeführt. Dort kam ein inverses Lichtmikroskop IX81 (Olympus, Hamburg) zum Einsatz, das mit einem UPlanSapo 100X/1.40 Ölobjektiv und einem UPlanSapo 60X/1.35 Ölobjektiv (Olympus, Hamburg) ausgestattet war. Es wurden 0,17 µm dicke Deckgläser und ImmersolTM 581 F Immersionsöl (Carl ZEISS, Jena, Germany) benutzt. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit „solid-state“-Lasern (488 nm / 50 mW, 561 nm / 50 mW; Visitron System, München) die von einem VS-AOTF100-System (Visitron System, München) angesteuert und über ein VS-20 Laser-Lens-System (Visitron System, München) in den Strahlengang eingespeist wurden. Für die Colokalisation von GFP/RFP-Signalen wurde ein Dual-View Microimager (Optical Insights, Tucson, USA) genutzt, der mit einem geeigneten Filtersatz für Laseranregung (GFP: ET-EGFP Filterset (F46-002), in F91-910 Olympus U-MF2 Filtermodul; RFP: TxRed HC Filterset (F36-504) in F91-910 Olympus U-MF2 Filtermodul; Beamsplitter z491/561 (F53-564) in F91-910 Olympus U-MF2 Filtermodul; alle Filter von AHF Analysetechnik, Tübingen) ausgerüstet war. Die z-Achsen-Aufnahmen erfolgten mit Unterstützung eines Piezoelements (NV40/1CL, Piezosystem Jena). Für die „photobleaching“-Experimente wurde ein 405 nm/ 60 mW dioden Laser, der durch einen ND 0.6 Filter abgedunkelt und den Strahlengang durch einen OSI-IX 71 Adaptor (Visitron System, Munich, Germany) gekoppelt wurde, verwendet. Der FRAP-Laser wurde durch ein UGA- 40 Steuerungsgerät (Rapp OptoElectronic GmbH, Hamburg, Germany) und der VisiFRAP 2D FRAP Programmsoftware für Meta Series 7.5.x (Visitron System, Munich, Germany) kontrolliert.

Bilder wurden mit einer, an das Mikroskopsystem gekoppelten, Kamera (Photometric CoolSNAP HQ2, Roper Scientific, Tucson, USA) aufgenommen. Die Steuerung des Mikroskops und der Kamera erfolgte durch die Software MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown, USA).

4.9.8 Bildverarbeitung

Nachbearbeitung aller Aufnahmen (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) erfolgten MetaMorph. Die Zusammenstellung und Bearbeitung der Abbildungen wurden mit Photoshop 6.0 (Adobe) und Corel Draw 12.0 (Corel) durchgeführt. Berechnungen und statistische Analysen erfolgten mit Excel (Microsoft) und Prism 4 (GraphPad, La Jolla). Zweidimensionale Deconvolution und Z-Achsen-Projektionen wurden mit MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown, USA) durchgeführt.

4.9.9 Bioinformatische Analysen

Nukleotidsequenzen wurden der dem „National Center of Biotechnology Information“ (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/) entnommen. Unter <http://expasy.org>, dem „ExPASy Molecular Biology Server“, wurden Aminosäuresequenzen abgerufen. Außerdem stellt diese Seite viele weitere hilfreiche Programme zur Verfügung, mit denen beispielsweise die Molekulargewichte von Proteinen bestimmt wurden. Auch ein BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“) Programm wird hier zur Verfügung gestellt. Multiple, mit dem Blast-Programm erhaltene homologe Aminosäuresequenzen wurden mit dem ClustalW-Programm des „EMBL Outstation European Bioinformatics Institute“ auf der Seite <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> verglichen. Man erhält rechnerisch ermittelte Sequenzanalysen, bei denen homologe, ähnliche und konservierte Aminosäuren markiert und in Prozentwerten angegeben werden. Phylogenetische und molekulare Evolutionsanalysen wurden mit MEGA 2.1 (Kumar et al, 2001) durchgeführt. Stammbäume wurden mit der Methode „Minimum Evolution“ konstruiert. Dabei wurde ein „Nearest neighbor joining“-Baum als Startpunkt und 1000 Bootstrap-„Replicates“ verwendet.

Weitere Sequenzanalysen erfolgten mit:

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg>) (Schultz et al, 2000; Schultz et al, 1998) zur Identifikation konservierter Domänen bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur

HMMTOP (URL: <http://www.enzim.hu/hmmtop/>) zur Vorhersage von Transmembrandomänen (Tusnady & Simon, 1998; Tusnady & Simon, 2001)

TMPRED (URL: http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) zur Vorhersage von Transmembrandomänen

CLONEMANAGER zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Planung von Klonierungen

COILS3 (URL: http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html, (Lupas et al, 1991) zur Identifikation von Coiled coil Regionen in einem Protein nach dem Algorithmus von Lupas

GENEDOC (Nicholas & Nicholas, 1997) zur Bearbeitung von Alignments (Schattierungen, Export als Enhanced Metafile) und Berechnung der Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten.

CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) zur Sequenzanalyse und Erstellung von Sequenzalignments.

CALMODULIN TARGET DATABASE (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/sequence.html>) zur Ermittlung von potentiellen IQ-Motiven.

4.10 Strukturelle Modellierung

Dieser Teil wurde in Kollaboration mit Nicolas Hamer an der School of Biosciences, University of Exeter, Stocker Road, Exeter EX4 4QD, UK, durchgeführt. Für die Berechnung eines vergleichenden Modells der *U. maydis* Msc1 Motordomäne wurde eine Auswahl bekannter, bereits kristallisierter Strukturen verschiedener Myosine in der „post-rigor“ Konformation verwendet. Die gewählten Strukturen sollten einen möglichst breiten Bereich Taxa und Myosin Klassen umfassen. Dabei wurden folgende Myosine in ihrer pseudo-ATP-gebundenen Konformationen verwendet: *Gallus gallus* Myosin der glatten Muskulatur (PDB ID: 2MYS; (Rayment et al, 1993)), *G. gallus* Myo5a (1W7J; (Coureux et al, 2004)) *Loligo pealei* Muskelmyosin (2OY6; (Yang et al, 2007)) und *D. discoideum* Myosin II (1MMD; (Fisher et al, 1995)). Sequenz-Vergleiche wurden mittels CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) erstellt und anschließend manuell bearbeitet. Unstrukturierte „loops“ wurden gesondert mittels jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) untersucht und in das Modell eingefügt. Vergleichende Modelle wurden mit Hilfe der Software MODELLER version 9.2 erstellt (Sali & Blundell, 1993). Aus 10 Modellen wurde eines, basierend auf der MODELLER Energie Funktion, der Ramachandran Plot Qualität und Konservierung Secondärstrukturen, ausgewählt. Abbildungen wurden unter Verwendung von PyMOL (DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, USA) angefertigt.

4.11 Untersuchungen zur Dimerisierung mittels Gelfiltration

Der oligomere Zustand von Mcs1 wurde mittels Gelfiltration an einer „Superdex™200 10/300GL“-Säule (GE Healthcare) mit einer Durchflussrate von 0,5 ml/min untersucht.

Die Kalibrierung erfolgte mit dem „Gel Filtration Standard“ (Biorad, München). Dieser enthält folgende Eichproteine: Vitamin B12 (1,35 kDa), Myoglobin (17 kDa), Ovalbumin (44 kDa), γ -Globulin (158 kDa) und Thyroglobin (670 kDa). Die Äquilibration der Säule sowie die Durchführung der Gelfiltration erfolgte in 10 mM Hepes (pH 7,5) mit 50 bzw. 500 mM NaCl. Für die Durchführung des Experiments wurden Pellets einer 500 ml Kultur HA-Mcs1HN und HA-Mcs1H exprimierender *U. maydis* Gesamtzellextrakte in 1 ml Puffer (10 mM Hepes (pH 7,5) mit 50 bzw. 500 mM NaCl) resuspendiert und die Zellen mit Hilfe des MP FastPrep-24 (MP Biomedicals, Heidelberg) mindestens 3-mal für 60 Sek. bei 6,5 m/s aufgebrochen. Die Zellextrakte wurden anschließend für 30 min bei 100000 g bei 4°C zentrifugiert und 250 μ l Überstand auf die Gelfiltrationssäule geladen.

Die einzelnen Fraktionen (250 μ l) wurden durch das Äkta FPLC-System (GE Healthcare, Uppsala) gesammelt und anschließend mittels Western-Blotting analysiert. Das Molekulargewicht der identifizierten Fraktionen wurde anhand der Eichgeraden bestimmt.

4.12 Co-Sedimentation der Myosin-Motordomäne mit Aktin

Die Affinität der Mcs1-Myosinmotordomäne in An- und Abwesenheit von ATP wurde durch Co-Sedimentationsexperimente untersucht. Dazu wurde die Myosin-Motordomäne durch das zellfreie Protein Expressions-System „TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation“ (Promega, Madison, USA) synthetisiert. Die Proteinsynthese erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz:

TNT® T7 Quick Master Mix	40 μ l
Methionin (1 mM)	1 μ l
2,25 μ g Plasmid DNA	x μ l
ad H ₂ O	50 μ l

Der Ansatz wurde für mindestens 2 h bei 30 °C inkubiert und vor Inkubation mit Aktin 30 min bei 100.000 g zentrifugiert.

Aktin wurde mit Hilfe des „Actin Binding Protein Biochem Kit; Non-Muscle Actin“ (Cytoskeleton) nach Herstellerangaben polymerisiert und anschließend für mindestens 1 h bei 100.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 μ l 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂ und 2 μ M Phalloidin (Sigma) aufgenommen und für 4 Stunden in diesem Puffer inkubiert, so dass sich die Aktin-Filamente komplett aus dem Pellet lösen. Man erhält einen phalloidin-stabilisierten F-Aktin stock von 23 μ M.

Die Reaktion erfolgte in einem Tris-HCl (20 mM; pH 8,0) Puffer. Für die Co-Sedimentations-Assays wurde ein Protein-Expressionsansatz auf 2 Reaktionen aufgeteilt (je 25 μ l) und mit 1,5 bis 3 μ M Aktin versetzt. Der Einfluss von ATP auf die Bindungsaffinität wurde durch Zugabe von Apyrase (0,5 Units) und ATP (5 mM) mit MgCl₂ (2 mM) untersucht. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und vor der Zentrifugation bei 4°C für 1 h bei 100.000 g noch einmal mit frischem ATP versetzt. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände getrennt gesammelt und die Pellets im Originalvolumen resuspendiert und alles mit SDS-Gelladepuffer versetzt. Die Detektion erfolgte mittels Immun-Blot.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abramczyk D, Park C, Szaniszlo PJ (2009) Cytolocalization of the class V chitin synthase in the yeast, hyphal and sclerotic morphotypes of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Fungal Genet Biol* **46**: 28-41
- Agrawal GK, Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekura, M., Kubo, A., Saji, H. (2002) Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*: 1061–1069
- Aichinger C, Hansson K, Eichhorn H, Lessing F, Mannhaupt G, Mewes W, Kahmann R (2003) Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Mol Genet Genomics* **270**: 303-314
- Alberts B, Bray D, Lewis J (2002) *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 4th ed., New York: Garland Publishing.
- Amnuaykanjanasin A, Epstein L (2003) A class V chitin synthase gene, *chsA* is essential for conidial and hyphal wall strength in the fungus *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*). *Fungal Genet Biol* **38**: 272-285
- Amnuaykanjanasin A, Epstein L (2006) A class Vb chitin synthase in *Colletotrichum graminicola* is localized in the growing tips of multiple cell types, in nascent septa, and during septum conversion to an end wall after hyphal breakage. *Protoplasma* **227**: 155-164
- Aschenbrenner L, Naccache SN, Hasson T (2004) Uncoated endocytic vesicles require the unconventional myosin, Myo6, for rapid transport through actin barriers. *Mol Biol Cell* **15**: 2253-2263
- Ayscough KR, Stryker J, Pokala N, Sanders M, Crews P, Drubin DG (1997) High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol* **137**: 399-416
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* **276**: 726-733
- Banuett F (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genetics*: 179-208
- Banuett F, Herskowitz I (2002) Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **37**: 149-170
- Banuett F, Quintanilla RH, Jr., Reynaga-Pena CG (2008) The machinery for cell polarity, cell morphogenesis, and the cytoskeleton in the Basidiomycete fungus *Ustilago maydis*-a survey of the genome sequence. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**: S3-S14
- Banuett F, H (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Dev* 2965-2976
- Bartnicki-Garcia S (2006) Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res* **6**: 957-965
- Bartnicki-Garcia S, Bartnicki DD, Gierz G, Lopez-Franco R, Bracker CE (1995) Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp Mycol* **19**: 153-159

- Bement WM, Mooseker MS (1995) TEDS rule: a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell Motil Cytoskeleton* **31**: 87-92
- Bohlmann R. (1996) Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Brachmann A, Weinzierl G, Kamper J, Kahmann R (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**: 1047-1063
- Bracker CE, Ruiz-Herrera J, Bartnicki-Garcia S (1976) Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 4570-4574
- Brand A, Gow NA (2009) Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Curr Opin Microbiol* **12**: 350-357
- Brefeld O (1883) In *Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie* Vol. Heft 5, pp 67-75.
- Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A, Kahmann R (2009) *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 423-445
- Brown SS (1997) Myosins in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 44-48
- Brunswick H (1924) In *Untersuchungen über Geschlechts- und Kernverhältnisse bei Hymenomycetengattung Coprinus*, Jena, Germany: Gustav Fischer.
- Brzeska H, Korn ED (1996) Regulation of class I and class II myosins by heavy chain phosphorylation. *J Biol Chem* **271**: 16983-16986
- Chen XW, Leto D, Chiang SH, Wang Q, Saltiel AR (2007) Activation of RalA is required for insulin-stimulated Glut4 trafficking to the plasma membrane via the exocyst and the motor protein Myo1c. *Dev Cell* **13**: 391-404
- Chigira Y, Abe K, Gomi K, Nakajima T (2002) chsZ, a gene for a novel class of chitin synthase from *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet* **41**: 261-267
- Choquer M, Boccara M, Goncalves IR, Soulie MC, Vidal-Cros A (2004) Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur J Biochem* **271**: 2153-2164
- Christensen JJ (1963) Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**
- Chuang JS, Schekman RW (1996) Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol* **135**: 597-610
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114.
- Coluccio LM (1997) Myosin I. *Am J Physiol* **273**: C347-359
- Cos T, Ford RA, Trilla JA, Duran A, Cabib E, Roncero C (1998) Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur J Biochem* **256**: 419-426
- Coureur PD, Sweeney HL, Houdusse A (2004) Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *EMBO J* **23**: 4527-4537

- Crampin H, Finley K, Gerami-Nejad M, Court H, Gale C, Berman J, Sudbery P (2005) *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkorper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *J Cell Sci* **118**: 2935-2947
- Cui Z, Ding Z, Yang X, Wang K, Zhu T (2009) Gene disruption and characterization of a class V chitin synthase in *Botrytis cinerea*. *Can J Microbiol* **55**: 1267-1274
- Dangl JL (1995) Piece de Resistance: novel classes of plant disease resistance genes. *Cell* **80**: 363-366
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833
- De Wit PJGM (2001) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2726-2732
- Desnos C, Huet S, Fanget I, Chapuis C, Bottiger C, Racine V, Sibarita JB, Henry JP, Darchen F (2007) Myosin va mediates docking of secretory granules at the plasma membrane. *J Neurosci* **27**: 10636-10645
- Doebley J (1992) Mapping the genes that made maize. *Trends Genet* **8**: 302-307
- Doehlemann G, van der Linde K, Assmann D, Schwammbach D, Hof A, Mohanty A, Jackson D, Kahmann R (2009) Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**: e1000290
- Doehlemann G, Wahl R, Horst RJ, Voll LM, Usadel B, Poree F, Stitt M, Pons-Kuhnemann J, Sonnewald U, Kahmann R, Kamper J (2008a) Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**: 181-195
- Doehlemann G, Wahl R, Vranes M, de Vries RP, Kamper J, Kahmann R (2008b) Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis* /maize pathosystem. *J Plant Physiol* **165**: 29-40
- Dürrwang U, Fujita-Becker S, Erent M, Kull FJ, Tsiavaliaris G, Geeves MA, Manstein DJ (2006) *Dictyostelium* myosin-IE is a fast molecular motor involved in phagocytosis. *J Cell Sci* **119**: 550-558
- Dunn AR, Spudich JA (2007) Dynamics of the unbound head during myosin V processive translocation. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 246-248
- Eckardt NA (2008) Chitin signaling in plants: insights into the perception of fungal pathogens and rhizobacterial symbionts. *Plant Cell* **20**: 241-243
- El Gueddari NE, Rauchhaus U, Moerschbacher B.M., Deising H.B. (2002) Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytologist*: 103-112
- Evangelista M, Klebl BM, Tong AH, Webb BA, Leeuw T, Leberer E, Whiteway M, Thomas DY, Boone C (2000) A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **148**: 353-362
- Evangelista M, Pruyne D, Amberg DC, Boone C, Bretscher A (2002) Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol* **4**: 260-269
- Fehrenbacher KL, Boldogh IR, Pon LA (2003) Taking the A-train: actin-based force generators and organelle targeting. *Trends Cell Biol* **13**: 472-477

- Fischer-Parton S, Parton RM, Hickey PC, Dijksterhuis J, Atkinson HA, Read ND (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc* **198**: 246-259
- Fisher AJ, Smith CA, Thoden JB, Smith R, Sutoh K, Holden HM, Rayment I (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF₄. *Biochemistry* **34**: 8960-8972
- Ford RA, Shaw JA, Cabib E (1996) Yeast chitin synthases 1 and 2 consist of a non-homologous and dispensable N-terminal region and of a homologous moiety essential for function. *Mol Gen Genet* **252**: 420-428
- Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3681-3686
- Fryer MJ, Oxborough K, Mullineaux PM, Baker NR (2002) Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *J Exp Bot* **53**: 1249-1254
- Fuchs U, Hause G, Schuchardt I, Steinberg G (2006) Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**: 2066-2081
- Fuchs U, Manns I, Steinberg G (2005) Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**: 2746-2758
- Fujiwara M, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M (1997) A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. *Biochem Biophys Res Commun* **236**: 75-78
- Fukuda K, Yamada K, Deoka K, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H (2009) Class III chitin synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* localizes at the sites of polarized cell wall synthesis and is required for conidial development. *Eukaryot Cell* **8**: 945-956
- Garcera-Teruel A, Xoconostle-Cazares B, Rosas-Quijano R, Ortiz L, Leon-Ramirez C, Specht CA, Sentandreu R, Ruiz-Herrera J (2004) Loss of virulence in *Ustilago maydis* by Umchs6 gene disruption. *Res Microbiol* **155**: 87-97
- Geeves MA, Holmes KC (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* **68**: 687-728
- Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG (1990) A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* **62**: 999-1006
- Geli MI, Lombardi R, Schmelzl B, Riezman H (2000) An intact SH3 domain is required for myosin I-induced actin polymerization. *EMBO J* **19**: 4281-4291
- Geli MI, Riezman H (1996) Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* **272**: 533-535
- Geli MI, Riezman H (1998) Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J Cell Sci* **111 (Pt 8)**: 1031-1037
- Gillissen B, Bergemann J, Sandmann C, Schröer B, Bölker M, Kahmann R (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**: 647-657

- Girbardt M (1955) Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L). *Planta* **50**: 47-59
- Goodson HV, Anderson BL, Warrick HM, Pon LA, Spudich JA (1996) Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **133**: 1277-1291
- Goodson HV, Warrick HM, Spudich JA (1999) Specialized conservation of surface loops of myosin: evidence that loops are involved in determining functional characteristics. *J Mol Biol* **287**: 173-185
- Govindan B, Bowser R, Novick P (1995) The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J Cell Biol* **128**: 1055-1068
- Govrin EM, Rachmilevitch S, Tiwari BS, Solomon M, Levine A (2006) An Elicitor from *Botrytis cinerea* Induces the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana* and Other Plants and Promotes the Gray Mold Disease. *Phytopathology* **96**: 299-307
- Grallert A, Martin-Garcia R, Bagley S, Mulvihill DP (2007) In vivo movement of the type V myosin Myo52 requires dimerisation but is independent of the neck domain. *J Cell Sci* **120**: 4093-4098
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4645-4649
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Harris SD, Read ND, Roberson RW, Shaw B, Seiler S, Plamann M, Momany M (2005) Polarisome meets spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* **4**: 225-229
- Heath IB, Gupta G, Bai S (2000) Plasma membrane-adjacent actin filaments, but not microtubules, are essential for both polarization and hyphal tip morphogenesis in *Saprolegnia ferax* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **30**: 45-62
- Hodge T, Cope MJ (2000) A myosin family tree. *J Cell Sci* **113 Pt 19**: 3353-3354
- Hodges AR, Kremmentsova EB, Trybus KM (2008) She3p binds to the rod of yeast myosin V and prevents it from dimerizing, forming a single-headed motor complex. *J Biol Chem* **283**: 6906-6914
- Hoffman CS, Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272
- Hoffmann J, Mendgen K (1998) Endocytosis and membrane turnover in the germ tube of uromyces fabae. *Fungal Genet Biol* **24**: 77-85
- Holliday R (1974) *Ustilago maydis*. In *Handbook of Genetics* King RC (ed), Vol. 1, pp 575–595. New York: Plenum Press
- Holweg C, Nick P (2004) *Arabidopsis* myosin XI mutant is defective in organelle movement and polar auxin transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10488-10493
- Horio T, Oakley BR (2005) The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**: 918-926

- Horiuchi H, Fujiwara M, Yamashita S, Ohta A, Takagi M (1999) Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **181**: 3721-3729
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel KH (1999) Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol* **119**: 1251-1260
- Ikonen E, de Almeida JB, Fath KR, Burgess DR, Ashman K, Simons K, Stow JL (1997) Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of p200 as nonmuscle myosin II on Golgi-derived vesicles. *J Cell Sci* **110** (Pt 18): 2155-2164
- Inoue A, Saito J, Ikebe R, Ikebe M (2002) Myosin IXb is a single-headed minus-end-directed processive motor. *Nat Cell Biol* **4**: 302-306
- Ito K, Kashiyama T, Shimada K, Yamaguchi A, Awata J, Hachikubo Y, Manstein DJ, Yamamoto K (2003) Recombinant motor domain constructs of *Chara corallina* myosin display fast motility and high ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **312**: 958-964
- Johnston GC, Prendergast JA, Singer RA (1991) The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J Cell Biol* **113**: 539-551
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Kahmann R, Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M. und J. Kämper (2000) *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. Fungal Pathology. Kronstad JWe (ed), pp 347-371. Dodrecht, The Netherlands: Kluwer academic publishers.
- Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 404-414
- Kämper J, Kahmann R, Bolker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Muller O, Perlin MH, Wosten HA, de Vries R, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Pena CG, Snetselaar K, McCann M, Perez-Martin J, Feldbrugge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JJ, Holloman W, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, Gonzalez-Prieto JM, Kennell JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Munch K, Rossel N, Scherer M, Vranes M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho EC, Cahill MJ, Boyce KJ, Klose J, Klosterman SJ, Deelstra HJ, Ortiz-Castellanos L, Li W, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Hauser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schluter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Guldener U, Munsterkotter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes HW, Mauceli EW, DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren BW (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97-101
- Kankanala P, Czymmek K, Valent B (2007) Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell* **19**: 706-724
- Kim JE, Lee HJ, Lee J, Kim KW, Yun SH, Shim WB, Lee YW (2009) *Gibberella zeae* chitin synthase genes, *GzCHS5* and *GzCHS7*, are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenicity. *Curr Genet* **55**: 449-459
- Kohler D, Ruff C, Meyhofer E, Bahler M (2003) Different degrees of lever arm rotation control myosin step size. *J Cell Biol* **161**: 237-241

- Kollmar M, Durrwang U, Kliche W, Manstein DJ, Kull FJ (2002) Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin. *Embo J* **21**: 2517-2525
- Konzack S, Rischitor PE, Enke C, Fischer R (2005) The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**: 497-506
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245
- Lamb C, Dixon RA (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Langford GM (1995) Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 82-88
- Latge JP (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* **66**: 279-290
- Lee WL, Bezanilla M, Pollard TD (2000) Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. *J Cell Biol* **151**: 789-800
- Lehmle C, Steinberg G, Snetselaar KM, Schliwa M, Kahmann R, Bolker M (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **16**: 3464-3473
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Lipschutz JH, Mostov KE (2002) Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr Biol* **12**: R212-214
- Liu H, Kauffman S, Becker JM, Szanislo PJ (2004) *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* WdChs5p, a class V chitin synthase, is essential for sustained cell growth at temperature of infection. *Eukaryot Cell* **3**: 40-51
- Liu X, Osherov N, Yamashita R, Brzeska H, Korn ED, May GS (2001) Myosin I mutants with only 1% of wild-type actin-activated MgATPase activity retain essential in vivo function(s). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9122-9127
- Loubery S, Coudrier E (2008) Myosins in the secretory pathway: tethers or transporters? *Cell Mol Life Sci* **65**: 2790-2800
- Loubradou G, Brachmann A, Feldbrugge M, Kahmann R (2001) A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **40**: 719-730
- Lupas A, Van Dyke M, Stock J (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**: 1162-1164.
- Machesky LM, Gould KL (1999) The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 117-121
- Madrid MP, Di Pietro A, Roncero MI (2003) Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol Microbiol* **47**: 257-266

- Martin-Urdiroz M, Roncero MI, Gonzalez-Reyes JA, Ruiz-Roldan C (2008) ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell* **7**: 112-121
- McGoldrick CA, Gruver C, May GS (1995) myoA of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J Cell Biol* **128**: 577-587
- Mckillop DFA, Fortune NS, Ranatunga KW, Geeves A (1994) The influence of 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM) on the interaction between actin and myosin in solution and in skinned muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil* **15**: 309-318
- Mehta AD, Rock RS, Rief M, Spudich JA, Mooseker MS, Cheney RE (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400**: 590-593
- Mellado E, Dubreucq G, Mol P, Sarfati J, Paris S, Diaquin M, Holden DW, Rodriguez-Tudela JL, Latge JP (2003) Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG-/chsE-) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **38**: 98-109
- Mendoza-Mendoza A, Berndt P, Djamei A, Weise C, Linne U, Marahiel M, Vranes M, Kamper J, Kahmann R (2009) Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **71**: 895-911
- Mermall V, Post PL, Mooseker MS (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**: 527-533
- Merrifield CJ (2004) Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis. *Trends Cell Biol* **14**: 352-358
- Milligan RA (1996) Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 21-26
- Molina L, Kahmann R (2007) An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *The Plant cell* **19**: 2293-2309
- Motegi F, Arai R, Mabuchi I (2001) Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol Biol Cell* **12**: 1367-1380
- Mrsa V, Tanner W (1999) Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **13**: 1145-1154
- Muller C, McIntyre M, Hansen K, Nielsen J (2002) Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1827-1836
- Mulvihill DP, Edwards SR, Hyams JS (2006) A critical role for the type V myosin, Myo52, in septum deposition and cell fission during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil Cytoskeleton* **63**: 149-161
- Mulvihill DP, Hyams JS (2003) Role of the two type II myosins, Myo2 and Myp2, in cytokinetic actomyosin ring formation and function in fission yeast. *Cell Motil Cytoskeleton* **54**: 208-216
- Murphy CT, Rock RS, Spudich JA (2001) A myosin II mutation uncouples ATPase activity from motility and shortens step size. *Nat Cell Biol* **3**: 311-315

- Nagahashi S, Sudoh M, Ono N, Sawada R, Yamaguchi E, Uchida Y, Mio T, Takagi M, Arisawa M, Yamada-Okabe H (1995a) Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**: 13961-13967
- Nagahashi S, Sudoh M, Ono N, Sawada R, Yamaguchi E, Uchida Y, Mio T, Takagi M, Arisawa M, Yamada-Okabe H (1995b) Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. *J Biol Chem* **270**: 13961-13967
- Nalavadi V, Nyitrai M, Bertolini C, Adamek N, Geeves MA, Bahler M (2005) Kinetic mechanism of myosin IXB and the contributions of two class IX-specific regions. *J Biol Chem* **280**: 38957-38968
- Neuhaus EM, Soldati T (2000) A myosin I is involved in membrane recycling from early endosomes. *J Cell Biol* **150**: 1013-1026
- Nicholas KB, Nicholas H, B. Jr. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
- Nino-Vega GA, Carrero L, San-Blas G (2004) Isolation of the CHS4 gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. *Med Mycol* **42**: 51-57
- Nino-Vega GA, Munro CA, San-Blas G, Gooday GW, Gow NA (2000) Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* **38**: 31-39
- Nishikawa S, Homma K, Komori Y, Iwaki M, Wazawa T, Hikikoshi Iwane A, Saito J, Ikebe R, Katayama E, Yanagida T, Ikebe M (2002) Class VI myosin moves processively along actin filaments backward with large steps. *Biochem Biophys Res Commun* **290**: 311-317
- Nürnberg T, Brunner F (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 318-324
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**: 249-266
- O'Connell CB, Tyska MJ, Mooseker MS (2007) Myosin at work: motor adaptations for a variety of cellular functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 615-630
- O'Connell RJ, Panstruga R (2006) Tete a tete inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol* **171**: 699-718
- O'Connell RJ RJ (1990) Chemical detection and ultrastructural localization of chitin in cell walls of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39-53
- Oberholzer U, Iouk TL, Thomas DY, Whiteway M (2004) Functional characterization of myosin I tail regions in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1272-1286
- Oberholzer U, Marcil A, Leberer E, Thomas DY, Whiteway M (2002) Myosin I is required for hypha formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **1**: 213-228
- Odenbach D, Thines E, Anke H, Foster AJ (2009) The *Magnaporthe grisea* class VII chitin synthase is required for normal appressorial development and function. *Mol Plant Pathol* **10**: 81-94

- Odrionitz F, Kollmar M (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol* **8**: R196
- Osherov N, Yamashita RA, Chung YS, May GS (1998) Structural requirements for in vivo myosin I function in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **273**: 27017-27025
- Park H, Ramamurthy B, Travaglia M, Safer D, Chen LQ, Franzini-Armstrong C, Selvin PR, Sweeney HL (2006) Full-length myosin VI dimerizes and moves processively along actin filaments upon monomer clustering. *Mol Cell* **21**: 331-336
- Park IC, Horiuchi H, Hwang CW, Yeh WH, Ohta A, Ryu JC, Takagi M (1999) Isolation of csml encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain from the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* **170**: 131-139
- Post PL, Tyska MJ, O'Connell CB, Johung K, Hayward A, Mooseker MS (2002) Myosin-IXb is a single-headed and processive motor. *J Biol Chem* **277**: 11679-11683
- Pruyne D, Bretscher A (2000) Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* **113** (Pt 4): 571-585
- Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A, Boone C (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* **297**: 612-615
- Purcell TJ, Morris C, Spudich JA, Sweeney HL (2002) Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14159-14164
- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**: 50-58
- Reck-Peterson SL, Tyska MJ, Novick PJ, Mooseker MS (2001) The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors. *J Cell Biol* **153**: 1121-1126
- Reineke G, Heinze B, Schirawski J, Buettner H, Kahmann R, Basse CW (2008) Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol Plant Pathol* **9**: 339-355
- Richards TA, Cavalier-Smith T (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* **436**: 1113-1118
- Riquelme M, Bartnicki-Garcia S, Gonzalez-Prieto JM, Sanchez-Leon E, Verdin-Ramos JA, Beltran-Aguilar A, Freitag M (2007) Spitzenkorper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **6**: 1853-1864
- Riquelme M, Gierz G, Bartnicki-Garcia S (2000) Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkorper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **146** (Pt 7): 1743-1752
- Rodriguez-Quinones JF, Irizarry RA, Diaz-Blanco NL, Rivera-Molina FE, Gomez-Garzon D, Rodriguez-Medina JR (2008) Global mRNA expression analysis in myosin II deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an impairment of cell integrity functions. *BMC Genomics* **9**: 34
- Rodriguez JR, Paterson BM (1990) Yeast myosin heavy chain mutant: maintenance of the cell type specific budding pattern and the normal deposition of chitin and cell wall components requires an intact myosin heavy chain gene. *Cell Motil Cytoskeleton* **17**: 301-308

- Rogat AD, Miller KG (2002) A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. *J Cell Sci* **115**: 4855-4865
- Rogers SL, Gelfand VI (1998) Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Curr Biol* **8**: 161-164
- Roncero C (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet* **41**: 367-378
- Rudolf R, Kogel T, Kuznetsov SA, Salm T, Schlicker O, Hellwig A, Hammer JA, 3rd, Gerdes HH (2003) Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J Cell Sci* **116**: 1339-1348
- Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R (2006a) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* **6**: 14-29
- Ruiz-Herrera J, Lopez-Romero E, Bartnicki-Garcia S (1977) Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *Mucor rouxii*. *J Biol Chem* **252**: 3338-3343
- Ruiz-Herrera J, Xoconostle-Cazares B, Reynaga-Pena CG, Leon-Ramirez C, Carabez-Trejo A (2006b) Immunolocalization of chitin synthases in the phytopathogenic dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *FEMS Yeast Res* **6**: 999-1009
- Ruppel KM, Spudich JA (1996) Structure-function studies of the myosin motor domain: importance of the 50-kDa cleft. *Mol Biol Cell* **7**: 1123-1136
- Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**: 779-815
- Sambrook J, Frisch, E.F. and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual.*, New York: Cold Spring Harbour.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Santos B, Snyder M (1997) Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol* **136**: 95-110
- Sasaki N, Asukagawa H, Yasuda R, Hiratsuka T, Sutoh K (1999) Deletion of the myopathy loop of *Dictyostelium* myosin II and its impact on motor functions. *J Biol Chem* **274**: 37840-37844
- Sasaki N, Shimada T, Sutoh K (1998) Mutational analysis of the switch II loop of *Dictyostelium* myosin II. *J Biol Chem* **273**: 20334-20340
- Sasaki N, Sutoh K (1998) Structure-mutation analysis of the ATPase site of *Dictyostelium discoideum* myosin II. *Adv Biophys* **35**: 1-24
- Schott DH, Collins RN, Bretscher A (2002) Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *J Cell Biol* **156**: 35-39
- Schuchardt I, Assmann D, Thines E, Schuberth C, Steinberg G (2005) Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**: 5191-5201
- Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* **28**: 231-234.

- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5857-5864.
- Schulz B, Banuett F, Dahl M, Schlesinger R, Schäfer W, Martin T, Herskowitz I, Kahmann R (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**: 295-306
- Schwaiger I, Sattler C, Hostetter DR, Rief M (2002) The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure. *Nat Mater* **1**: 232-235
- Seabra MC, Coudrier E (2004) Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic* **5**: 393-399
- Seiler S, Nargang FE, Steinberg G, Schliwa M (1997) Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J* **16**: 3025-3034
- Sharpless KE, Harris SD (2002) Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol Biol Cell* **13**: 469-479
- Shimada T, Sasaki N, Ohkura R, Sutoh K (1997) Alanine scanning mutagenesis of the switch I region in the ATPase site of *Dictyostelium discoideum* myosin II. *Biochemistry* **36**: 14037-14043
- Siegrist J, Kauss H (1990) Chitin deacetylase in cucumber leaves infected by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*: 267-275
- Sietsma JH, Beth Din A, Ziv V, Sjollem KA, Yarden O (1996) The localization of chitin synthase in membranous vesicles (chitosomes) in *Neurospora crassa*. *Microbiology* **142** (Pt 7): 1591-1596
- Sietsma JHuW, J.H.G. (1994) Apical wall biogenesis. In *The Mycota I*, J.H.G. Wessel und F. Meinhardt e (ed), pp 126-141. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Snetselaar KM, Bolker M, Kahmann R (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol* **20**: 299-312
- Snetselaar KMaCWM (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*: 193-203
- Snetselaar KMaCWM (1993) Infection of maize by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathology*: 843-850
- Snetselaar KMuCWM (1994) Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res* 347-355
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Specht CA, Liu Y, Robbins PW, Bulawa CE, Iartchouk N, Winter KR, Riggle PJ, Rhodes JC, Dodge CL, Culp DW, Borgia PT (1996) The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet Biol* **20**: 153-167
- Spudich JA, Sivaramakrishnan S (2010) Myosin VI: an innovative motor that challenged the swinging lever arm hypothesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 128-137

- Stakman EC (1915) Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J Agric Res* 193-299
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JD (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**: 661-667
- Steinberg G (2007a) Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryot Cell* **6**: 351-360
- Steinberg G (2007b) Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytol* **174**: 721-733
- Steinberg G, Perez-Martin J (2008) *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* **18**: 61-67
- Steinberg G, Schliwa M, Lehmler C, Bolker M, Kahmann R, McIntosh JR (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci* **111** (Pt 15): 2235-2246
- Straube A, Brill M, Oakley BR, Horio T, Steinberg G (2003) Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **14**: 642-657
- Struchholz S, Elfrink K, Pieper U, Kalhammer G, Honnert U, Grutzner A, Linke WA, Liao W, Bahler M (2009) Functional role of the extended loop 2 in the myosin 9b head for binding F-actin. *J Biol Chem* **284**: 3663-3671
- Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R (2008) Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**: 339-351
- Takeshita N, Ohta A, Horiuchi H (2002) csmA, a gene encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain of *Aspergillus nidulans*, is translated as a single polypeptide and regulated in response to osmotic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **298**: 103-109
- Takeshita N, Ohta A, Horiuchi H (2005) CsmA, a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain, is localized through direct interaction with the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**: 1961-1970
- Takeshita N, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H (2006) *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol Microbiol* **59**: 1380-1394
- Taylor EPI, Cameron DS (1973) Preparation and Quantitative Analysis of Fungal Cell Walls: Strategies and Tactics. *Annual Review of Microbiology* **27**: 243-259
- Thordal-Christensen H, Zhang, Z., Wei, Y. und D.B. Collinge (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J*: 1187-1194
- Torrallba S, Raudaskoski M, Pedregosa AM, Laborda F (1998) Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **144** (Pt 1): 45-53

- Tusnady GE, Simon I (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol* **283**: 489-506
- Tusnady GE, Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**: 849-850
- Tuxworth RI, Titus MA (2000) Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay. *Traffic* **1**: 11-18
- Umemoto S, Sellers JR (1990) Characterization of in vitro motility assays using smooth muscle and cytoplasmic myosins. *J Biol Chem* **265**: 14864-14869
- Uyeda TQ, Abramson PD, Spudich JA (1996) The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4459-4464
- Vale RD (1996) Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors. *J Cell Biol* **135**: 291-302
- van der Vaart JM, Caro LM, Chapman JW, Klis FM, Verrips CT (1995) Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**: 3104-3110
- Varadi A, Tsuboi T, Rutter GA (2005) Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6 beta-cells. *Mol Biol Cell* **16**: 2670-2680
- Virag A, Griffiths AJ (2004) A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. *Fungal Genet Biol* **41**: 213-225
- Virag A, Harris SD (2006) The Spitzenkörper: a molecular perspective. *Mycol Res* **110**: 4-13
- von Ropenack E, Parr A, Schulze-Lefert P (1998) Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J Biol Chem* **273**: 9013-9022
- Wang ZY, Wang F, Sellers JR, Korn ED, Hammer JA, 3rd (1998) Analysis of the regulatory phosphorylation site in *Acanthamoeba* myosin IC by using site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15200-15205
- Watanabe M, Nomura K, Ohyama A, Ishikawa R, Komiya Y, Hosaka K, Yamauchi E, Taniguchi H, Sasakawa N, Kumakura K, Ushiki T, Sato O, Ikebe M, Igarashi M (2005) Myosin-Va regulates exocytosis through the submicromolar Ca²⁺-dependent binding of syntaxin-1A. *Mol Biol Cell* **16**: 4519-4530
- Weber I, Assmann D, Thines E, Steinberg G (2006) Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**: 225-242
- Weber I, Gruber C, Steinberg G (2003) A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **15**: 2826-2842
- Wedlich-Söldner R, Bölker M, Kahmann R, Steinberg G (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **19**: 1974-1986

- Werner S, Sugui JA, Steinberg G, Deising HB (2007) A Chitin Synthase with a Myosin-Like Motor Domain Is Essential for Hyphal Growth, Appressorium Differentiation, and Pathogenicity of the Maize Anthracnose Fungus *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1555-1567
- Wessels JHG (1990) Role of cell wall architecture in fungal tip growth generation. In *Tip growth in plant and fungal cells*, I.B. Heath e (ed), pp 1-29. San Diego, CA, USA: Academic Press
- Win TZ, Gachet Y, Mulvihill DP, May KM, Hyams JS (2001) Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, Myo51 is a component of the cytokinetic actin ring. *J Cell Sci* **114**: 69-79
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322** (Pt 3): 681-692
- Woo M, Lee K, Song K (2003) MYO2 is not essential for viability, but is required for polarized growth and dimorphic switches in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 195-202
- Woolner S, Bement WM (2009) Unconventional myosins acting unconventionally. *Trends Cell Biol* **19**: 245-252
- Wu Q, Sandroock TM, Turgeon BG, Yoder OC, Wirsal SG, Aist JR (1998a) A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. *Mol Biol Cell* **9**: 89-101
- Wu X, Bowers B, Rao K, Wei Q, Hammer JA, 3rd (1998b) Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *J Cell Biol* **143**: 1899-1918
- Yamashita RA, May GS (1998) Constitutive activation of endocytosis by mutation of myoA, the myosin I gene of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **273**: 14644-14648
- Yang Y, Gourinath S, Kovacs M, Nyitray L, Reutzel R, Himmel DM, O'Neill-Hennessey E, Reshetnikova L, Szent-Gyorgyi AG, Brown JH, Cohen C (2007) Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor. *Structure* **15**: 553-564
- Yildiz A, Forkey JN, McKinney SA, Ha T, Goldman YE, Selvin PR (2003) Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300**: 2061-2065
- Yount RG, Lawson D, Rayment I (1995) Is myosin a "back door" enzyme? *Biophys J* **68**: 44S-47S; discussion 47S-49S
- Zhao Y, Park RD, Muzzarelli RA (2010) Chitin deacetylases: properties and applications. *Mar Drugs* **8**: 24-46
- Ziman M, Chuang JS, Schekman RW (1996) Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol Biol Cell* **7**: 1909-1919

LEBENS LAUF

Steffi Treitschke

Geboren am 06. Juni 1980 in Lauchhammer

SCHULAU SBILDUNG

1987-1993	Grundschule, Schipkau
1993-2000	Gymnasium Senftenberg
2000	Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

2001-2006	Diplomstudium, Technische Universität Kaiserslautern
2006	Diplom-Biologe, Diplomarbeit durchgeführt im Fachbereich Phytopathologie (AG Hahn): „1. Etablierung des RNAi-vermittelten Gen-silencing im Grauschimmelerreger <i>Botrytis cinerea</i> und 2. Untersuchung von Genen mit starken Phänotyp mittels RNAi: <i>BcCreA</i> , ein putativer transkriptioneller Repressor der Katabolitrepression; <i>BcPKC</i> , eine zentrale Komponente der Zellwand-Integritäts MAP-Kinase Signalwegs.“

PROMOTION

2006-April 2010	Doktorarbeit an der Philipps-Universität Marburg, durchgeführt am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abt. Organismische Interaktionen (Marburg) und der „School of Biosciences“, Universität Exeter, unter der Betreuung von Prof. Dr. G. Steinberg
-----------------	---

Gefördert durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 1216

Thema: „Zellbiologische und biochemische Charakterisierung des *Ustilago maydis* Virulenzfaktors Mcs1 (Myosin-Chitinsynthase 1)“

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Gero für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und der stetigen Diskussionsbereitschaft bedanken. Vielen Dank für die Unterstützung und die gewährten Freiräume bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Maier für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Frau Renkawitz-Pohl und Frau Kahmann für Ihre Bereitschaft, meiner Prüfungskommission anzugehören.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Graduiertenkolleg 1216 für die finanzielle Unterstützung und für alles, was ich im Rahmen dieses Programms lernen und erleben durfte. In diesem Zusammenhang gebührt mein Dank besonders Herrn Maier und Lucette Claudet für die tolle Organisation und Unterstützung.

Ein weiteres Dankeschön geht an alle, die es mir ermöglicht haben unter diesen besonderen Umständen meine Doktorarbeit durchführen zu können. Dies gilt besonders für Gero und das GraKo 1216 für die gelungene Fernbetreuung und die finanzielle Unterstützung, sowie Frau Kahmann und Gunther Döhlemann für die Bereitstellung von Laborausstattung und vielen weiteren Hilfestellungen.

Des Weiteren danke ich den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe in Exeter, im Besonderen Martin Schuster, der mich bei der „Bändigung“ des Mikroskops und in vielen anderen Lebenslagen sehr unterstützt hat, sowie Magdalena Martín-Urdíroz für die Unterstützung bei der Erhebung fehlender Datensätze und Yvonne Roger für viel Freude bei meinen Exeter-Aufenthalten.

Ich danke der AG Döhlemann und Mitgliedern der AG Kahmann, für die ständige Unterstützung und die Anregungen sowie den vielen kleinen und größeren Gefälligkeiten und der tollen Zusammenarbeit! Ein Extra-Dankeschön geht an Gunther, der mich in die Kunst der konfokalen Mikroskopie einweihte, Karina für die Unterstützung in biochemischen Fragen, Steffi für ihren ständigen Beistand und die Hilfestellung bei der Gelfiltration und Nicolas Harmer für die tolle Zusammenarbeit zur Anfertigung der Mcs1-Modelle.

Für Ihre fortwährende mentale und fachliche Unterstützung, der andauernden Diskussionsbereitschaft, dem intensiven Korrigieren meiner Arbeit sowie der Möglichkeit eines sportlichen Ausgleichs (klettern) möchte ich mich ganz, ganz herzlich bei Kerstin Schipper bedanken. Ein besonderer Dank geht ebenfalls an Familie Reissmann-Thanbichler, für das ständige Gewähren einer Übernachtungsmöglichkeit inklusive Vollpension. Besonders möchte ich auch Valentin danken, der durch seine süße Art so manchen Ärger vergessen ließ.

Auch für so manche schöne Stunde während aber auch abseits der Arbeit möchte ich Familie Reissmann-Thanbichler, Kerstin, Alex, Gunther, Patrick, Karina, Christoph, Dani, Daniela, Christian, Armin, aber auch Juri, Anne-Marie, Vera, Petro sowie der Familie Schuster und Yvonne danken. Danke für eure Freundschaft, eure hohe Motivation und dem einen oder anderen Witzchen, die den Frust manchmal erträglicher machten.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meiner Familie und „Schwiegerfamilie“, die mich während meines Studiums und dieser Arbeit unterstützt und mir Halt gegeben haben, ganz herzlich bedanken. Danke Teckel für deine Unterstützung, deine Vernunft, für Zuspruch und Ansporn.